

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**OCORRÊNCIA DE CLOSTRIDÍOS PATOGÊNICOS EM SOLO
DE PASTAGEM DA MICRO-REGIÃO DE JABOTICABAL, SP.**

Adriana Valim Ferreira Ragazani

Orientador: Prof. Dr. Rubén Pablo Schocken-Iturrino

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Microbiologia (Microbiologia Agropecuária).

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL
Novembro de 2007

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ADRIANA VALIM FERREIRA RAGAZANI - nascida em Ituverava - SP, no dia 30 de novembro de 1971, formada no Centro Universitário “Barão de Mauá” na área de Ciências Biológicas Modalidade Médica (Biomedicina), na cidade de Ribeirão Preto–SP, concluído no ano de 1999; realizou estágio no laboratório Municipal de Análises Clínicas de Ituverava, no setor de Hematologia e Bioquímica, no período de junho a julho de 1999; realizou estágio no Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto – SP, no período de setembro de 1999 a abril de 2000; realizou estágio no Laboratório de Microbiologia Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal - SP, no período de maio a junho de 2000; realizou estágio no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP Jaboticabal - SP, no período de junho de 2000 a janeiro de 2002; ingresso no Mestrado em Microbiologia Agropecuária, no período de março de 2002 e concluído em fevereiro de 2004; ingresso no Doutorado em Microbiologia Agropecuária, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP Jaboticabal – SP, no período de março de 2004 a novembro de 2007.

“Não é possível alcançar o verdadeiro sucesso sem enfrentar
oposições e impedimentos. Mas é possível viver o resto da vida sem
ser derrotado”.

David Schwartz

Dedico

*Aos meus pais pela minha vida,
pelo afeto,
amor e pela oportunidade
de realização de um grande sonho.
E a toda minha família pelo carinho,
amor e força para vencer.*

Ao Edson,

*Meu esposo, por fazer parte de minha vida
e por me ajudar a realizar este sonho
através de seu apoio e compreensão
nos momentos difíceis.
Você é muito especial, obrigada.*

*Ao Matheus, meu filho,
Pelos seus dois aninhos, mesmo que pequenino,
pode me oferecer muito amor e
enormes sorrisos nas horas mais difíceis .
Pela alegria de viver e me mostrar
como é maravilhoso ser MÃE.
Obrigada meu anjinho*

*`A DEUS,
por me dar a oportunidade da realização deste GRANDE SONHO,
vencendo barreiras e obstáculos de maneira simples , porém com grande
ajuda de pessoas amadas.
Muito obrigada a todos que estiveram comigo sempre.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Rubén Pablo Schocken-Iturrino, pelo apoio, colaboração, dedicação, oportunidade que me concedeu em poder aprender e ampliar meus conhecimentos e pela amizade com que me recebeu e me orientou nesses anos de convivência; ficando intitulado como meu segundo PAI.

A Profa. Dra. Maria Luiza Poiatti, pelo carinho, disponibilidade e pela verdadeira amizade firmada nestes anos de convivência ;

A Profa. Dra. Alessandra Medeiros pela disponibilidade e valiosa colaboração e principalmente pelo carinho durante esses anos;

Ao Prof. Dr. Hélio José Montassier, pelo incentivo, colaboração e disponibilidade para compartilhar seus valiosos conhecimentos;

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Monteiro pelo incentivo, colaboração e disponibilidade para compartilhar seus valiosos conhecimentos;

Ao Prof. Dr. Fernando Ávila pelo incentivo, colaboração e disponibilidade para compartilhar seus valiosos conhecimentos;

Aos todos os professores que fizeram parte da banca de qualificação e de defesa por todo apoio, e valiosos conhecimentos.

À técnica do laboratório Silvina Pelicano Berchielli, pelo auxílio nas análises e pela grande amizade;

As amigas, Mariana, Tammy, Caroline, Márcia, Gisela, e aos amigos Juliano e César pelo companheirismo, colaboração, apoio e principalmente pela grande amizade e todos os momentos compartilhados;

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia, Edna, João, Lourdinha, Assis, Rosângela, e a todos os amigos dos demais laboratórios, pela amizade e convívio;

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. As principais Clostridioses que ocorrem no Brasil.....	4
2.1.1. Botulismo e Tétano.....	4
2.1.2. Mionecroses: carbúnculo sintomático, manqueira ou mal de ano; gangrena gasosa ou edema maligno.....	7
2.1.3. Enterotoxemia.....	8
2.1.4. Hemoglobinúria bacilar e hepatite necrótica.....	9
2.2. Clostrídios isolados de solos e de animais.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Local e Obtenção das amostras.....	15
3.2. Metodologia de coleta.....	15
3.3. Análise microbiológica.....	15
3.3.1. Contagem de bactérias anaeróbias esporuladas (Gênero <i>Clostridium</i> Sp)	18
3.3.2. Caracterização e Identificação de <i>Clostridium</i> spp patogênicos.....	20
3.3.3. Bioensaio em camundongos.....	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
5. CONCLUSÕES.....	39
6. REFERÊNCIAS.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1 Localização das fazendas onde foram coletadas as amostras de solo de pastagem, da micro-região de Jaboticabal-SP, no período de junho a dezembro de 2006.	17
2. Faixas de valores das contagens, frequência e porcentagens de <i>Clostridium</i> spp, em amostras de solo de pastagem da micro-região de Jaboticabal-SP.	24
3. Caracterização e Identificação de <i>Clostridium</i> spp patogênicos em amostras de solo de pastagem, da micro-região de Jaboticabal-SP, no período de junho a dezembro de 2006.	31

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Mapa com as localizações das fazendas onde foram coletadas amostras de solo de pastagem, da micro-região de Jaboticabal-SP, no período de junho a dezembro de 2006.	16
2. Sistema de incubação para bactérias anaeróbicas, jarras anaeróbicas contendo placas semeadas com amostras de solos de pastagem da micro-região de Jaboticabal – SP, no período de junho a dezembro de 2006	19
3. Placas com os meios Agar Padrão para Contagem (PCA); Agar Sulfito Polimixina Sulfadiazina (SPS); Agar Reinforced Clostridial (RCA), para contagem de bactérias anaeróbicas esporuladas (<i>Clostridium</i> sp), em solos de pastagem da micro-região de Jaboticabal – SP, no período de junho a dezembro de 2006.	19
4. Frascos contendo o meio Cooked Meat Médium (CMM), inoculados com amostras de solo de pastagem da micro-região de Jaboticabal–SP, no período de junho a dezembro de 2006. ..	22
5. Identificação bioquímica das amostras de <i>Clostridium</i> spp. patogênicos em solo de pastagem, da região micro-região de Jaboticabal-SP, no período de junho a dezembro de 2006.	22
6. Placa de Agar Reinforced Clostridial , para contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) para <i>Clostridium</i> sp, em amostras de solo de pastagem da micro-região de Jaboticabal – SP, no período de junho dezembro de 2006.	23

Figura	Página
7. Valores médios das contagens de <i>Clostridium</i> sp em solo de pastagem, da micro-região de Jaboticabal - SP, no período de junho a dezembro de 2006.	24
8. Relação entre as médias das contagens com os meses de coleta de amostras de solo de pastagem da micro-região de Jaboticabal-SP, no período de junho a dezembro de 2006.	26
9. Dias de chuva nos meses de coleta de amostras de solo de pastagem da micro-região Jaboticabal-SP, no período de junho a dezembro de 2006.	26
10. Ocorrência de bactérias anaeróbias esporuladas em solos de pastagem, da micro-região de Jaboticabal-SP, no período de junho a dezembro de 2006.	28

Figura	Página
11. Ocorrência de <i>Clostridium</i> sp patogênicos em solos de pastagem, da micro-região de Jaboticabal-SP, no período de junho a dezembro de 2006.	29
12. Isolamento e Identificação de <i>Clostridium</i> patogênicos em amostras de solo de pastagem, micro-região de Jaboticabal, no período de junho a dezembro de 2006.	30

“OCORRÊNCIA DE CLOSTRIDIÓIS PATOGÊNICOS EM SOLO DE PASTAGEM DA MICRO-REGIÃO DE JABOTICABAL,SP”

RESUMO - Entre as espécies de *Clostridium* de importância em patologia animal, destaca-se o *Clostridium perfringens*, o *Clostridium botulinum*, o *Clostridium chauvoei*. O objetivo desta pesquisa foi verificar a presença de bactérias anaeróbias esporuladas (*Clostridium* sp), assim como, identificar as espécies de *Clostridium* patogênicos para a saúde animal, principalmente de bovinos, no solo de pastagem da micro-região de Jaboticabal, SP. Foram coletadas 250 amostras de solo e realizadas contagens de bactérias esporuladas do gênero *Clostridium* e identificação das espécies patogênicas presentes. Os resultados permitiram demonstrar a contagem de UFC de *Clostridium* sp com média em \log_{10} igual a 2,79, sendo que os valores mínimo e máximo obtido foram 2,15 e 3,68 respectivamente. Para caracterização e identificação, os resultados permitiram identificar a presença de bactérias anaeróbias esporuladas em 233 amostras (93,2%), entre estas 180 eram do gênero *Clostridium*. Após realização bioquímica foram identificados Clostrídios patogênicos em 42 amostras, sendo o *C. perfringens* em 23 amostras (9,2 %), o *C. botulinum* em 13 amostras (5,2%), e o *C. chauvoei* em 6 amostras (2,4%). Para a pesquisa da toxina botulínica através do teste de bioensaio em camundongos, revelou-se a produção de toxina botulínica em 13 amostras (5,2%), confirmando a toxigenicidade das amostras identificadas de *C. botulinum*. Os resultados revelaram uma contaminação ambiental por Clostrídios patogênicos capazes de prejudicar a saúde animal, podendo ocasionar grandes perdas econômicas.

Palavras-Chave: *Clostridium perfringens*, *C. botulinum*, *C. chauvoei* ,patologia animal.

“OCCURRENCE OF PATHOGENIC CLOSTRIDIOS IN PASTURE SOIL OF REGION OF JABOTICABAL,SP”

SUMMARY – The species of *Clostridium* of major importance to animal pathology are *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, and *C. chauvoei*. Considering this, the objective of this research was to verify the presence of anaerobic sporulate bacteria (*Clostridium* sp), and also identify the species of pathogenic *Clostridium* for the animal health, mostly to bovine, in pasture soil of Jaboticabal-SP. A total of 250 samples were collected and used to determine the number of sporulated bacteria from *Clostridium* gender and identify the pathogenic species present. The results demonstrated that the average number of CFU in log₁₀ of *Clostridium* sp was 2,79, and the minimum and maximum values obtained were 2,15 and 3,68 respectively. After characterization and isolation and identification, the results showed the presence of 233 samples (93,2%) of sporulated bacteria, of these 180 were of *Clostridium* gender. The biochemical tests were identified in 42 samples, being 23 samples (9,2%) of *Clostridium perfringens*, 13 samples (5,2%) of *Clostridium botulinum* and 6 samples (2,4%) of *C. chauvoei*. The research of botulinum toxin through the bioassay in mice was demonstrated the presence in 13 samples (5,2%), confirming the toxigenicity of *C. botulinum* identified samples. These results demonstrated an environmental contamination with pathogenic Clostridios what could be a potential risk to the health of the animals and also cause losses economical.

KEYWORDS: *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *C. chauvoei*, animal pathology.

1. INTRODUÇÃO

A produção animal no Brasil é realizada, principalmente, sob o pastejo direto em pastagens tropicais cultivadas. O rebanho bovino encontra-se distribuído por todo o país, com principal participação da Região Centro-Oeste constando de 34,80%, em seguida a região Norte com 19,45%, Sudeste com 19,26%, Sul com 13,79% e Nordeste com 12,70%. Na região nordeste do Estado de São Paulo, a micro-região de Jaboticabal apresenta 64.496 hectares de área rural, entre estes estão 1338 hectares de pastagem, ou seja 2,09% da área do Município. A cultura da cana de açúcar prevalece na economia da região, porém verifica-se uma parcela representativa de produtores de bovinos em que o sistema de alimentação baseia-se principalmente na utilização de pastagens.

Neste contexto, o solo, como substrato básico para o desenvolvimento e crescimento das pastagens, representa um ecossistema dinâmico e complexo. Sua população microbiana é representada por uma quantidade altamente diversa de microrganismos como bactérias, fungos, algas, protozoários e vírus em equilíbrio dinâmico.

A maioria das bactérias do solo é heterotrófica, sendo as mais comuns, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Nitrobacter*,. Quanto aos esporulados sua presença é principalmente para as bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, entre outras. Esses microrganismos são responsáveis por grandes transformações bioquímicas, funcionando como elo entre animais, plantas e meio ambiente (solo) promovendo a manutenção da vida na Terra. Pode ser citado como exemplo um sistema simbiótico de fixação de nitrogênio realizado

pelo *Rhizobium* quando associados as leguminosas, que pode aumentar consideravelmente a produção da safra, tornando a presença desse microrganismo de grande importância na agricultura (PELCZAR et al., 1996). Contudo, nesse mesmo ambiente, o solo pode abrigar bactérias patogênicas que podem veicular ou causar infecções nos animais. Um dos principais representantes da microbiota epifítica patogênica é o gênero *Clostridium*.

O gênero *Clostridium* está constituído de bactérias anaeróbias, que apresentam como principal característica a produção de esporos, o que os torna resistentes a condições adversas. Sendo tais bactérias componentes da microbiota do trato intestinal do homem e animais, além de estarem presentes no solo e água (STERNE & BATTY, 1975). Sua prevalência e distribuição têm sido estudadas por todos os continentes principalmente Europa (KNOCK, 1952; WILLIAMSON et al., 1999; DHAKED et al., 2002; ZECHMEISTER et al., 2005).

Os animais podem-se contaminar com as bactérias diretamente do solo e água, através da ingestão do pasto. Na espécie bovina, a via de contaminação por *Clostridium sp.* pode ocorrer também através da ingestão de materiais de origem animal presente no pasto como, ossos de carcaças de animais em decomposição (LANGENEGGER et al., 1983); ou por ingestão de água contaminada por animais mortos recentemente, contendo a toxina e esporos de *Clostridium botulinum* (SCHOCKEN-ITURRINO et al., 1990; KRIEK et al., 1994).

Dessa forma, quando os esporos de *Clostridium botulinum* encontram condições favoráveis para germinar, reproduzir-se e produzir toxinas, podem gerar infecções endógenas. Outros clostrídios, também presentes no solo, como *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. novyi*, causam infecções exógenas através da

contaminação em feridas ou pela ingestão de esporos presentes no alimento (ONDERDONK & ALLEN, 1994).

Deve-se ressaltar que existem ao redor de 100 espécies do gênero *Clostridium* distribuídas em áreas geográficas distintas. Contudo, aproximadamente 10% são consideradas de importância em patologia animal. Tais espécies bacterianas podem ser, com base em sua patogenia, agrupadas como causadoras de: - doenças neurotrópicas (*Clostridium botulinum*, *C. tetani*); - mionecroses ou carbúnculo sintomático e gangrena gasosa (*C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. novyi*, *C. sordellii* e *C. perfringens*); - enterotoxemias (*C. perfringens*); - hemoglobinúria bacilar e hepatite necrótica (*C. haemolyticum* e *C. novyi*) (LOBATO, 2000).

Admite-se que o *Clostridium* sp sejam ubiqüitários podendo, portanto, manter-se no solo por longo período de tempo e eventualmente podem ser transportados a longas distâncias por diferentes animais (como urubus, lobos, entre outros), fatores ambientais (como vento e água) e outros mecanismos biológicos mais complexos (como furacão e ciclone) (HARIHARAN & MITCHELL, 1977; CASTEEL, et al., 2006).

Embora as clostridioses sejam enfermidades conhecidas há um longo tempo, ainda hoje elas representam um alto risco para a pecuária, dado os significativos danos econômicos que acarretam (DUTRA, 2001).

No Brasil, não há trabalhos realizados com relação a quantificação de bactérias anaeróbias esporuladas (*Clostridium* sp) em solos de pastagem e raros são os trabalhos recentes, que se dedicaram a fazer a identificação das espécies patogênicas, de importância em patologia animal. A grande incidência de casos de

Clostridioses em bovinos no Brasil, causando grandes porcentagens de perdas, despertou incentivo à realização deste experimento.

Os objetivos do presente experimento foram:

1) Verificar a ocorrência de microrganismos patogênicos do gênero *Clostridium* de interesse na saúde animal, em solo de pastagem da micro-região de Jaboticabal,SP;

2) Caracterizar e identificar as espécies patogênicas encontradas;

3).Verificar se as espécies encontradas são produtoras de toxina botulínica;

2. REVISÃO DE LITERATURA

Desde que WAKSMAN & WOODRUFF (1940) verificaram a sobrevivência de microrganismos patogênicos no solo, o estudo do solo como reservatório natural ou refúgio temporário de microrganismos patógenos, resultou no interesse para maiores conhecimentos a este respeito.

O gênero *Clostridium* compreende um grupo de microrganismos Gram-positivos, anaeróbios, formadores de esporos e produtores de toxinas que se encontram ubiqüitariamente distribuídos. As condições nutricionais favoráveis e a anaerobiose presente no trato intestinal dos mamíferos são atrativas a diversas espécies de clostrídios (McCLAINE et al., 2004).

Existem ao redor de 100 espécies de *Clostridium* sp distribuídas em áreas geográficas distintas, muitas são constituintes das microbiotas intestinais dos animais e humanos, e algumas podem causar enfermidades nos animais, ocasionando grandes prejuízos econômicos (LOBATO & ASSIS, 2005).

As infecções e intoxicações causadas pelas bactérias do gênero *Clostridium* nos animais, podem ser classificadas em grupos distintos, sendo que aproximadamente dez diferentes síndromes em bovinos são causadas por 14 espécies diferentes de *Clostridium* (LOBATO & ASSIS, 2005; STERNE, 1981).

2.1. As principais Clostridioses que ocorrem no Brasil

2.1.1. Botulismo (*Clostridium botulinum*) e Tétano (*Clostridium tetani*)

São doenças neurotrópicas, ou seja, que afetam principalmente o sistema nervoso, nas quais os agentes etiológicos são *Clostridium botulinum* (botulismo) e *C. tetani* (tétano).

O botulismo é uma intoxicação específica, resultante da ingestão e absorção pela mucosa digestiva de toxinas pré-formadas pelo *Clostridium botulinum*. Sob condições de anaerobiose e temperatura favoráveis, a bactéria se multiplica e produz a toxina altamente letal, sendo responsável por levar grande número de animais a morte.

O *Clostridium botulinum* é um bastonete Gram positivo, anaeróbio obrigatório, móvel, peritríqueo. Pode ser destruído à temperatura de 121° C por 15 minutos, enquanto suas toxinas são destruídas a 100°C por 20 minutos. O pH ideal para o *Clostridium botulinum* é de neutro a alcalino, e a temperatura entre 30 e 37°C (QUINN et al., 1994), porém há relatos da sobrevivência de esporos de *C. botulinum* a temperatura de 4°C (SCHOCKEN-ITURRINO, 1980).

A grande importância de *Clostridium botulinum*, deve-se a sua capacidade de produzir esporos. O esporo bacteriano é o mecanismo mais eficaz de sobrevivência na natureza. Os esporos de *Clostridium botulinum* estão entre os esporos bacterianos mais resistentes, tendo sobrevivido mais de 30 anos em um meio fluido e provavelmente por mais tempo em meio seco (SMITH & SUGIYAMA, 1988).

São conhecidos sete tipos sorológicos deste microrganismo, com distribuição mundial. Sendo estes sete produtores de 7 diferentes tipos de toxinas (A, B, C, D, E, F e G). As toxinas A, B, E, e F são freqüentemente responsáveis pelo botulismo humano (ACHA & SYFRES, 1986), enquanto que as toxinas C e D causam botulismo em bovinos, eqüinos, ovinos e esporadicamente em outros animais (SMITH & SUGYIAMA, 1988). O *Clostridium botulinum* tipo G produz a toxina G, que foi isolada no solo da Argentina e já foi associada à ocorrência de intoxicações em seres humanos (GIMENEZ & CICCARELLI, 1976).

Em relação aos bovinos, as vacas são as mais afetadas, em gestação ou lactação, criadas em pastagens deficientes em fósforo, as quais passam a desenvolver o hábito da osteofagia ou sarcofagia (forma endêmica), podendo ingerir junto com as carcaças neurotoxinas tipo C e D produzidas pelo *C. botulinum* tipo C e D (LOBATO & ALMEIDA, 1997).

Juntamente com os alimentos, o esporo passa, em geral, pelo trato digestório do animal sem causar problemas, mas em carcaças o esporo encontra condições ideais de anaerobiose para se desenvolver e produzir toxinas, contaminando os ossos, cartilagens, tendões e aponeuroses que são mais resistentes a decomposição. Com isso, ao ingerir fragmentos de tecidos e ossos os bovinos podem adquirir a toxina e também os esporos, estabelecendo assim a cadeia epidemiológica (LANGENEGGER & DOBEREINER, 1988).

Os bovinos podem intoxicar-se também ao ingerir toxinas presentes em: - cama de frango, feno ou silagens contaminadas (compactados acidentalmente com pequenos animais em decomposição) (SMITH, 1977; SCHOCKEN-ITURRINO et al., 1991); - ou então, em águas estagnadas (SCHOCKEN-ITURRINO et al., 1990; DUTRA et al., 1990).

Quanto ao *Clostridium tetani*, sabe-se que é encontrado predominantemente no solo adubado e fezes de animais domésticos. Ademais é mundialmente distribuído no solo e freqüentemente transitório no intestino. Acomete todos os mamíferos, sendo que os eqüinos, ruminantes e suínos são os mais sensíveis. Animais que são submetidos á tosquia, castração, cura de umbigo, caudectomia, ou sofrem infecções urinárias pós-parto, ou ainda participam de brigas, são mais susceptíveis à contaminação pelo agente, podendo desenvolver a doença. Ainda foi verificado que o tétano pode ocorrer quando feridas são infectadas com esporos do microrganismo, germinando e produzindo toxina, porém há relatos de surtos de bovinos sem nenhuma ferida, em uma patologia denominada “tétano idiopático” (STERNE, 1981). A doença pode se desenvolver num período de 1 a 3 semanas (BIZZINI, 1993).

Sabe-se também que os esporos do microrganismo podem-se manter infectantes no solo por períodos superiores a 40 anos (LOBATO & ASSIS, 2005).

2.1.2. Mionecroses: Carbúnculo sintomático, Manqueira, Mal de ano (*Clostridium chauvoei*) e Gangrena gasosa ou Edema maligno (*C. septicum*, *C. novyi*, *C. sordelli*, *C. perfringens*)

Mionecroses são resultantes da multiplicação e produção de toxinas por algumas espécies de *Clostridium* na musculatura, com a conseqüente lesão muscular e toxemia. Vários fatores podem desencadear a infecção como, traumas, isquemias, entre outros. Estes fatores propiciam a germinação de esporos e conseqüente produção de toxinas (LOBATO & ALMEIDA, 1997).

Vem ocorrendo, no país, grande número de surtos de mionecroses decorrentes de falhas no processo de vacinação, como ausência de trocas de agulhas, excesso de matéria orgânica em criatórios. Carbúnculo sintomático é uma mionecrose, também conhecida como “manqueira” e “mal de ano”, que tem como principal agente o *C. chauvoei*. Os bovinos, ovinos e caprinos são as principais espécies acometidas. Suínos são raramente afetados e eqüinos são resistentes. O microrganismo pode ser encontrado no sistema digestivo, em feridas e também no solo.

Esporos de *C. chauvoei* são ingeridos através de alimentos e permanecerem em latência na musculatura esquelética até que algum trauma desencadeie a germinação e desenvolvimento da doença, caracterizado por uma bacteremia e toxemia letais (SCHOCKEN-ITURRINO et al., 2000; LOBATO & ASSIS, 2005). A doença é freqüentemente associada a presença de pastagens luxuriantes, coincidindo principalmente com o período de verão em que há abundância de chuvas nas pastagens, mas constitui um problema para algumas

áreas secas (HULLAND, 1993). A sobrevivência de *C. chauvoei* no solo sob a forma de esporos é um fator de grande significância na transmissão aos animais (UZAL et al., 2003). A incidência da doença tem aumentado depois do preparo da terra para uso para pastagem (STERNE & BATTY, 1975).

A gangrena gasosa ou edema maligno afeta bovinos de qualquer idade, é uma infecção exógena, produzida por um ou mais microrganismos associados: *C. septicum*, *C. chauvoei*, *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. sordelli*. Estes microrganismos infectam os animais através de feridas na pele, membrana mucosa, através de tosquias, partos, castração, vacinas entre outros (SMITH, 1984; MORRIS et al., 2002).

As lesões são semelhantes á manqueira, entretanto a gangrena gasosa é tipicamente uma celulite, ou seja, afeta principalmente o tecido subcutâneo (HULLAND, 1993). Em geral, a musculatura esquelética e tecido subcutâneo apresentam extensivo edema crepitante associado a ocorrência de hemorragia e necrose, exalando acentuado odor rançoso, podendo variar conforme a associação dos microrganismos envolvidos (STERNE & BATTY, 1975; LOBATO & ALMEIDA, 1997).

2.1.3. Enterotoxemia (*Clostridium perfringens*, *C. sordelli*, *C. septicum*)

É causada pelos cinco tipos de *C. perfringens* tipo A, B, C, D e E, além de *C. sordelli* e *C. septicum*. . Devido a maior importância sanitária e econômica será descrita a enterotoxemia causada pelo *C. perfringens* tipo D. Este microrganismo é um bastonete Gram-positivo, anaeróbio, formador de esporos, que está

amplamente distribuído no solo, nas fezes e nos intestinos de animais sadios. Acomete ovinos, caprinos e bovinos. É também conhecida como doença do rim pulposo ou doença da superalimentação. Mudanças bruscas na alimentação, dietas ricas em carboidratos e proteínas, propiciam a germinação e produção de toxina (LOBATO & ASSIS, 2005).

Geralmente, animais com 3 dias e 6 meses de idade são os mais afetados. Contudo, na região Centro-Oeste do Brasil, a doença acomete com maior intensidade bovinos adultos (SILVEIRA et al., 1995).

2.1.4. Hemoglobinúria Bacilar (*Clostridium novyi*) e Hepatite Necrótica (*C. haemolyticum*)

São infecções nas quais os microrganismos *C. haemolyticum* e *C. novyi* são responsáveis pelo quadro de hepatite necrótica e hemoglobinúria bacilar, respectivamente.

Hemoglobinúria é uma enfermidade que ocorre em bovinos e ovinos, e está associada a áreas úmidas, ou seja em localização geográfica limitada. O principal fator desencadeante da doença está relacionado com a migração de vermes trematódeos, que causam danos no tecido hepático, permitindo a proliferação do agente e produção de toxina. (VALENTE & CUTERI, 1997).

Hepatite necrótica ocorre devido a associação de *C. novyi* e *Fasciola hepática*. A doença também é conhecida como “black disease”, devido à presença de sangue venoso cianótico no tecido subcutâneo, produzido pela ação da toxina (SMITH, 1984).

2.2. Clostridíós isolados de solos ou de animais

Clostridium botulinum é um microrganismo mundialmente disseminado e tem sido isolado de amostras de solo de todos os continentes e em sedimentos. A maior ocorrência é no solo. A partir daí chega a contaminar alimentos, por se transformar na forma altamente resistente de esporos, os quais resistem tanto ao calor quanto à dessecação. (SCHOCKEN - ITURRINO, 1986).

Na África do Sul, o nome botulismo é “lamsiekte”, na Austrália, “paralisia bulbar”; no Sul dos Estados Unidos, “loindisease” e no Senegal, como “gniedo”. O botulismo foi inicialmente descrito em bovinos por GRAHAM & SCHWARZE (1921) na Austrália, e logo após por SEDDON (1922), quando descobriu que a doença nesses animais, chamada de “paralisia bulbar”, era na verdade uma intoxicação pelo consumo de restos de carne que teriam sido contaminados com o microrganismo que ele denominou de *Bacillus* para *Botulinus*.

O *Clostridium botulinum* tipo D foi isolado da carcaça de uma vaca morta por “Lamsiekte”, doença paralisante, responsável pela morte de muitas reses, anualmente, na África do Sul (MEYEER & GUNNISON, 1928).

Na África, nas regiões Sul e Sudeste, KNOCK (1952) relatou a presença de *C. botulinum* tipo D em 3% das amostras. O *Clostridium botulinum* tipo D foi detectado no sul da África, onde ocorre grande número de perdas de bovinos (MASON, 1968).

Na Rússia, um extenso trabalho foi realizado por KRAVCHENKO & SHISHULINA (1967), que examinaram mais de 4.200 amostras de solo na pesquisa de *C. botulinum* e *C. tetani*.

No Japão, a maior frequência é de *C. botulinum* tipo E; KODAMA (1970) analisou 6.883 amostras de solo da zona costeira, rios e lagos, na região de Akita, isolando o *C. botulinum* tipo E de 20 amostras (0,3%).

NIEVES & GABALDON (1976) analisaram solos do Estado de Mérida, na Venezuela, e relataram a presença de *Clostridium botulinum* do tipo A e C.

SMITH (1978) verificaram a ocorrência de *C. botulinum* e *C. tetani* em 260 amostras de solos dos Estados Unidos, demonstrando a presença da primeira bactéria em 61 amostras (23,5%) e do *C. tetani* em 88 amostras (33,8%).

NOTERMANS et al. (1979), em experimento realizado na Holanda, demonstraram que o *C. botulinum* pode se multiplicar em pastagens, pode produzir toxinas suficientes para matar uma vaca que ingerisse de 10 a 100 g de pasto contaminado.

HUSS (1980) relata a distribuição de *C. botulinum* em solos e sedimentos marinhos na Dinamarca, Ilhas Faroé, Grêland, Bangladesh, descrevendo que as amostras de solos cultivados apresentaram a maior presença desse microrganismo comparado ao solo virgem.

GALEY et al. (2000) descreveram surtos de botulismo em gado leiteiro, resultante da ingestão de alimento contaminado com esporos de *C. botulinum*, na Califórnia. No mesmo ano, KELCH et al. (2000), relatam a morte de gado da raça

Holstein, contaminados por *C. botulinum* presente em cevada empacotada que servia como alimento para os animais, no Estado de Tennessee Estados Unidos.

C. botulinum tem sido discutido como o agente causador da “doença de pasto” em cavalos, nos Estados Unidos (COLLIER et al., 2001) e Botulismo visceral em gado, na Alemanha (BOHNEL et al., 2001).

No Brasil, WARD et al. (1967) foi pioneiro em analisar amostras de areias coletadas de açudes do Estado do Ceará e praias de Fortaleza, sendo que 26 amostras constataram o *C. botulinum* tipos A, B, C, e F em 5 amostras (19,2%).

No Brasil, o botulismo bovino foi identificado pela primeira vez no Estado do Piauí (TOKARNIA et al., 1970), nas décadas seguintes (1980 e 1990) foram diagnosticados casos de Clostridioses em outras criações e em quase todo o território brasileiro (DOEBEREINER et al., 1992).

TAVARES (1985), descreveram para o Brasil, a presença de *C. tetani* nas fezes de bovinos e de eqüinos, conseqüentemente a contaminação do solo.

DOBEREINER et al. (1992) descreveram o botulismo epizoótico em bovinos no Brasil, relatando também que amostras de solo das fazendas, com histórias clínicas de botulismo seguido de mortes, verificaram a presença de *C. botulinum* e toxina botulinica. O bioensaio é ainda hoje o método “gold standard” para a estimativa da bioatividade de todos os tipos e subtipos sorológicos da toxina botulinica (GAO, 1984).

Em todo o Brasil, surtos têm sido registrados nos últimos anos, acometendo sobretudo fêmeas em gestação ou lactação, com a estimativa de centenas de mortes (DOBEREINER et al., 1992; DUTRA & DOBEREINER , 1995). Um importante fator que contribui para o agravamento do problema foi a intensificação da contaminação ambiental pelos esporos de *C. botulinum*, principalmente a partir de cadáveres em

decomposição nos pastos (RIBAS et al., 1994). Em Pernambuco, estes autores verificaram a presença de esporos e toxinas de *C. botulinum* em costelas de cadáveres de bovinos em diferentes níveis de decomposição, obtidos em propriedades rurais em que ocorreram mortalidades por botulismo, sendo que 46,55% foram positivas.

SILVA et al.(1998) realizaram estudos para verificar a ocorrência de *C. botulinum* tipos C e D em amostras de solo, limo e fezes de búfalos, em áreas de criação de búfalos do Estado do Maranhão. Revelaram que 104 (74,3%) das 140 amostras analisadas foram positivas para *C. botulinum*.

A enterotoxemia é relatada há tempos por criadores de bovinos, caprinos e ovinos, e também por veterinários como uma doença comum e importante devido a grande mortalidade que acarreta nos animais acometidos (STERNE & BATTY, 1978). O microrganismo foi denominado inicialmente como *Bacillus ovitoxicus*, quando isolado pela primeira vez em 1932 (citado por KRIEK, 1994). Em 1956, OXER descreveu a enfermidade na Austrália, com a bactéria já denominada *C. perfringens*. Na mesma época, diversos autores relatam a ocorrência da enfermidade na Alemanha, Inglaterra, Bulgária, Canadá, França, Estados Unidos Índia, Irã, Rússia, Turquia, entre outros países (JENSEN, 1974).

A primeira revisão completa sobre as doenças causadas pelo *C. perfringens* foi feita em Paris, por PREVOT et al. (1967) sendo estes os primeiros a analisar a crescente freqüência de casos de enterotoxemias por *C. perfringens* em diversas espécies de animais domésticos.

O agente está disseminado na natureza e tem sido isolado principalmente de solo em áreas enzóticas de enterotoxemia, nos Estados Unidos (CARTER & CHENGAPPA, 1993).

A persistência de *C. perfringens* no ambiente deriva de casos anteriores de enterotoxemia ou da constante contaminação fecal proveniente de várias espécies de animais que tem o microrganismo como parte da flora intestinal normal (PUGH, 2002).

Na Venezuela, no Estado de Anzótegui, o *C. perfringens* foi isolado de bezerro de 9 meses de idade, associado com quadro de enterotoxemia (PINEDA et al., 2004).

No Brasil, SARAIVA (1978) descreveu no Estado Rio Grande do Sul, casos de enterotoxemia em 20 bovinos com a presença de *C. perfringens*, sendo que 1 bovino tinha 6 dias de idade, sendo este o primeiro caso diagnosticado em bovino com esta idade no referido Estado.

Em 1995, BALDASSI et al. descreveram surtos de enterotoxemia causada por *C. perfringens* em cabras em lactação. VESCHI et al. (2005) observaram surtos de enterotoxemia em caprinos leiteiros, no Rio Grande do Sul.

Ainda no Brasil, GONÇALVES et al.(2006) relataram o primeiro caso de mastite necrótica bovina por *Clostridium perfringens* tipo A, e descrevem também que a grande contaminação ambiental, favorecida pelas condições climáticas e acúmulo de matéria orgânica, propiciaram a contaminação da papila mamária pelo microrganismo, instalando o processo infeccioso.

Em 2006, no Estado de Minas Gerais, LOBATO et al. identificaram enterotoxemia em 5 vacas em lactação, ocasionada pelo *C. perfringens* tipo D, esses animais tinham sido alimentados anteriormente com casquinha de soja contaminada.

Um levantamento sobre infecções clostridiais em animais, na Índia, HARBOLA & KUMAR (1990), analisaram o conteúdo intestinal e pedaços de músculos de diferentes espécies de animais, entre estas 38 amostras de bovinos com casos de black quarter e identificaram o *C. perfringens* em 5 amostras (13,1%) e *C. chauvoei* e *C. septicum* em 13 amostras (34,2%).

No Brasil, chama-se a atenção para o grande número de surtos de mionecroses que vêm ocorrendo no país decorrentes de falhas no processo de vacinação, principalmente devido á falta de assepsia no sítio vacinal, criatórios com excesso de matéria orgânica, ausência de trocas de agulhas entre animais, entre outros fatores.

Em um levantamento realizado no Estado de São Paulo, durante 10 anos (1970-1979), sobre a incidência da Gangrena gasosa e do carbúnculo sintomático, BALDASSI et al. (1985) analisando 2082 amostras suspeitas das doenças citadas, relataram a presença de *C. septicum* em 63 amostras (3,02%) e *C. chauvoei* em 163 amostras (7,82%).

Em Itacarambi - Minas Gerais, ASSIS et al.(2002) reportaram um surto de gangrena gasosa por *C. septicum* em bovinos, no qual os animais morreram 30 dias após a vacinação Recentemente, ASSIS et al. (2005) descreveram outro surto de carbúnculo sintomático, clássico em bezerros de 4 - 8 meses de idade, provenientes do município de Nova União, Minas Gerais.

No Estado da Bahia ocorreram dois surtos de mionecroses em ovelhas da raça Santa Inês devido a *C. chauvoei* (ASSIS et al., 2004).

São raros os relatos sobre surtos de hemoglobinúria bacilar. Porém, na década de 60, foi relatado um surto de Hemoglobinúria bacilar, na região do litoral norte do Estado do Rio Grande do Sul, onde ocorreu a morte de 2500 bovinos (GUERREIRO et al., 1962). Não foram encontrados relatos de isolamento ou detecção de *C. novyi* e *C. haemolyticum* em solos de pastagem.

O uso de pastagens naturais no sistema pecuário justifica-se por ser uma fonte de alimento de baixo custo para ruminantes. Além do mais, são ecologicamente corretas e quando bem manejadas, reflete-se em ganhos econômicos (HEITSCHMIDT et al., 1996).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 250 amostras de solos de pastagem, para bovinos e caprinos, em 25 fazendas da região de Jaboticabal – SP, distribuídas por 22 regiões identificadas por GPS, podem ser visualizadas na Figura 1., no período de junho a dezembro de 2006. As fazendas estão caracterizadas na Tabela 1. utilizando-se as coordenadas em latitude e altitude, apresentando solo tipo Latossolo Vermelho. Segundo relato dos proprietários das fazendas, todos os animais que se encontravam no pasto foram vacinados conforme o quadro de vacinação obrigatória, o que não inclui vacinação contra Clostridioses.

Na última década, tem havido um crescente número de casos diagnosticados de clostridioses em amostras de origem bovina em todo o país (BALDASSI et al., 2002). No entanto, não foram relatados pelos produtores problemas recentes e suspeitos de clostridioses em bovinos nos locais de coleta do presente experimento.

Foram coletados aproximadamente 300g de solo, a uma profundidade entre 0 a 20 cm, usando-se espátulas e pá previamente esterilizados para cada amostra, e acondicionados em sacos plásticos (TOMÉ Jr., 1997), perfazendo um total de 12 amostras por fazenda. As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia – Departamento de Patologia Veterinária, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP – Jaboticabal - SP.

No laboratório, as amostras foram devidamente registradas e conservadas em geladeira até a realização da análise microbiológica.



Figura 1. Mapa com as localizações das propriedades onde foram coletadas amostras de solo de pastagem, da micro-região de Jaboticabal-SP, no período de junho a dezembro de 2006.

Tabela 1. Localização das fazendas onde foram coletadas as amostras de solo de pastagem, da micro-região de Jaboticabal-SP, no período de junho a dezembro de 2006.

Propriedades	WGS 84	FUSO-22K	UTM	FUSO-22K
	LATITUDE	LONGITUDE	NORTE	LESTE
01	-21 13' 35,70082"	-48 22' 52,79494"	7650517,2800	771813,5000
02	-21 09' 57,45593"	-48 15' 38,42936"	7657020,2500	784460,6200
03	-21 13' 51,25587"	-48 22' 33,71685"	7650029,5700	772355,9200
04	-21 04' 24,86994"	-48 21' 45,24666"	7667432,5000	774043,8130
05	-21 06' 55,94718"	-48 21' 36,32077"	7662780,0000	774224,4380
06	-21 16' 47,47397"	-48 18' 32,56580"	7644490,6500	779220,1700
07	-21 12' 32,70493"	-48 17' 53,71456"	7652310,4400	780474,6300
08	-21 12' 09,10996"	-48 19' 14,67676"	7653076,1300	778150,9600
09	-21 13' 01,64919"	-48 24' 42,34129"	7651616,9600	768670,5000
10	-21 13' 37,65131"	-48 17' 34,73970"	7650302,7600	780987,9100
11	-21 11' 33,29967"	-48 24' 19,11587"	7654324,2100	769385,0900
12	-21 13' 45,15497"	-48 19' 36,24737"	7650131,5200	777478,6400
13	-21 10' 25,52973"	-48 17' 08,99087"	7656201,4000	781832,0900
14	-21 18' 50,45046"	-48 24' 36,58567"	7640882,7400	768660,4900
15	-21 11' 17,09336"	-48 23' 15,55118"	7654792,6800	771227,4200
16	-21 11' 08,85583"	-48 10' 49,75757"	7654677,1610	792753,3100
17	-21 15' 52,79969"	-48 24' 42,73874"	7646351,4100	768572,8000
18	-21 07' 59,51194"	-48 16' 47,89468"	7660683,7700	782517,9500
19	-21 07' 45,16442"	-48 16' 51,66456"	7661127,0900	782416,6800
20	-21 13' 19,42920"	-48 26' 08,51860"	7651110,4200	766175,5100
21	-21 15' 30,99508"	-48 23' 59,32839"	7647001,7000	769835,8000
22	-21 15' 05,15285"	-48 22' 24,56905"	7647751,5700	772582,0200

3.1. CONTAGEM DE BACTÉRIAS ANAERÓBIAS ESPORULADAS (GÊNERO *CLOSTRIDIUM* SP)

As amostras de solo foram devidamente homogeneizadas e pesadas 25 g de cada uma. Logo após, estas foram diluídas em vidros contendo 225 mL de água peptonada estéril a 0,1%. Sendo que, a seguir elas foram agitadas por 5 min, em agitador orbital. Todas as amostras foram submetidas a um choque térmico, a temperatura de 80°C por período de 10 min, e resfriando-se rapidamente em água aproximadamente a 30°C, com a finalidade de destruir células vegetativas contaminantes e ativar a germinação dos esporos (AURELI & FERRINI, 1983).

Após o choque térmico, 1 mL de cada amostra foi diluído, com pipeta estéril, em tubo contendo 9 mL de solução salina estéril a 0,85%, fazendo-se diluições seriadas até 10⁻⁶. De cada diluição foram retirados 0,1 mL e semeados em placas de Petri estéreis, utilizando-se o Método em superfície, sendo que foram utilizados 3 meios: Agar Padrão para Contagem (PCA - DIFCO®); Agar Sulfito Polimixina Sulfadiazina (SPS DIFCO®); Agar Reinforced Clostridial (RCA – OXOID®), todos em duplicatas. As placas foram incubadas a 37°C, em jarras anaeróbicas, com o sistema Gás-Pak®, por um período de 5 (cinco dias) (SEGNER et al., 1971), conforme está demonstrado na Figura 2.

Após este período, nas placas com os dois primeiros meios (PCA e SPS) foram observados crescimentos espalhados, disformes e difusos, impedindo a individualização para a contagem até as diluições testadas (10⁻⁶). No meio RCA, as colônias apresentaram-se mais individuais e com características típicas como centro ressaltado e cor levemente amarelada, opaca, com margens irregulares em

forma rizóide, conforme demonstrado na Figura 3. De cada colônia diferente foram realizados esfregaços corados pelo Método de Gram, confirmando as características morfológicas sendo bastonetes Gram positivos, com esporos subterminais e realizado o teste de catalase (catalase negativo) para diferenciá-los e descartar a suspeita do gênero *Bacillus* (catalase positivo). Após a confirmação foi realizada a contagem.

As médias do número de colônias por placa em UFC (Unidades Formadoras de Colônia) foram transformadas em logaritmo de Base 10.



Figura 2. Sistema de incubação para bactérias anaeróbicas, jarras anaeróbicas contendo placas semeadas com amostras de solos de pastagem da micro-região de Jaboticabal – SP, no período de junho a dezembro de 2006.



Figura 3. Placas com os meios Agar Padrão para Contagem (PCA); Agar Sulfito Polimixina Sulfadiazina (SPS); Agar Reinforced Clostridial (RCA), para contagem de bactérias anaeróbias esporuladas (*Clostridium* sp), em solos de pastagem da micro-região de Jaboticabal – SP, no período de junho a dezembro de 2006.

3.2. CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE *CLOSTRIDIUM* SPP PATOGÊNICOS

Para o isolamento de bactérias esporuladas do gênero *Clostridium*, foram pesados 25 g de cada amostra e diluídas em vidros com tampa de rosca contendo 225 mL do meio de enriquecimento Cooked Meat Medium (CMM – DIFCO®), ajustado o pH para 7,2, previamente esterilizado e reduzido (POLAQUINI et al., 2003) (Figura 4).

Após inoculação, as amostras foram submetidas a choque térmico em banho maria a temperatura de 80 °C, por um período de 10 min, resfriando-se em seguida a 30°C em água com gelo. Os vidros foram hermeticamente fechados e incubados a 37°C em estufa bacteriológica, por um período de 24 - 48 h. Após este período, foi observado crescimento por meio da turvação e produção de gás, como demonstrado na Figura 4. Os tubos positivos foram submetidos a esfregaços corados pelo método de Gram, visualizando morfologicamente bastonetes Gram positivos com esporos ovais subterminais característicos do gênero *Clostridium*, como descrito por HOLT et al. (1994).

As amostras positivas foram semeadas em 3 placas de Petri estéreis contendo o meio Ágar Reinforced Clostridial (RCA – OXOID®), sendo que 2 placas foram incubadas por um período de 24 a 48 h em jarras de anaerobiose com o sistema Gás-Pak® (SEGNER et al., 1971) e uma placa foi incubada em aerobiose, para descartar a possibilidade de aeróbios (gênero *Bacillus*).

Após o período de incubação, as colônias apresentaram crescimentos característicos de *Clostridium* sp, como centro ressaltado e cor levemente amarelada, opaca, com margens irregulares em forma rizóide, no ágar RCA (SMITH, 1977). Essas colônias foram repicadas para tubos de ensaio contendo caldo infusão de cérebro e coração (BHI – DIFCO®), acrescidos de 0,5% de cloridreto de cisteína (agente redutor) e incubados em anaerobiose a 37°C, por um período de 24 a 48 h. Após esse período, foram realizados, novamente, esfregaços corados pelo método de Gram e o teste de catalase, para diferenciar as colônias de *Clostridium* sp de as *Bacillus* sp, já que os Clostrídios são bastonetes Gram positivos e catalase negativos, e os *Bacillus* sp, que são catalase positivos.

Posteriormente, foram realizados os testes para caracterização bioquímica, a fim de identificar as espécies patogênicas do gênero *Clostridium* presentes em cada amostra, as provas recomendadas por QUINN, 1994, tais como: - fermentação dos açúcares (glicose, maltose, lactose, sacarose); hidrólise da gelatina; teste da motilidade; produção de indol; produção de gás; redução de nitrato; atividade da lecitinase, lipase, hemólise. Parte dos testes bioquímicos podem ser observadas na Figura 5.

Considerando que o *Clostridium botulinum*, *C. tetani*, *C. perfringens* produzem toxinas foi também realizado o teste biológico para a detecção de toxinas em camundongos criados em laboratório.

2.1. BIOENSAIO EM CAMUNDONGOS

As amostras positivas para o gênero *Clostridium* sp, em caldo BHI, foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos e os sobrenadantes foram filtrados em membrana Millipore (0,45µm), para eliminar a presença de bactérias e esporos. Em seguida, 0,5 mL do filtrado foi inoculado intraperitonealmente em pares de camundongos raça Swiss Albina, linhagem Webster, com peso corporal entre 22 e 25 g. Como controle, foram inoculados camundongos com os mesmos materiais aquecidos a 100°C, durante 15 minutos, sofrendo a desnaturação e inativação da toxina eventualmente presente, descartando, desse modo, a ocorrência de mortes por presença de outras substâncias (SMITH, 1977).

Os animais foram observados duas vezes por dia, durante um período de 5 a 10 dias, observando a presença de sintomas característicos de botulismo, como dificuldade de locomoção, dificuldade respiratória (formação de “cintura de vespa”) ou pela morte dos camundongos por paralisia flácida, com exceção dos animais que receberam a alíquota desnaturada (controle) que sobrevivem (HUHTANEN et al., 1981).



Figura 4. Frascos contendo o meio Cooked Meat Médium (CMM), inoculados com amostras de solo de pastagem, da micro - região de Jaboticabal–SP, no período de junho a dezembro de 2006.

Figura 5. Identificação bioquímica das amostras de *Clostridium* spp. patogênicos em solo de pastagem, da micro-região de Jaboticabal-SP, no período de junho a dezembro de 2006.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre as 250 amostras de solos de pastagem submetidas às análises para determinar a frequência de *Clostridium* spp, 233 amostras (93,2%) demonstraram positividade para bactérias anaeróbias (do gênero *Clostridium*), e em 17 amostras (6,8%) não houve nenhum crescimento de bactérias anaeróbias. O meio Reinforced Clostridial Agar, foi o meio de cultura que apresentou o melhor crescimento para contagem de *Clostridium* spp no presente experimento, como demonstrado na Figura 6 .



Figura 6. Placa de Agar Reinforced Clostridial, para contagem de bactérias anaeróbias esporuladas (gênero *Clostridium* sp), em amostras de solo de pastagem da micro-região de Jaboticabal – SP, no período de junho dezembro de 2006.

As contagens foram separadas por faixas de valores variando de 0 a 5000 UFC/g, desta forma foi possível observar que as maiores contagens encontraram-se na faixa entre 400-600 UFC/g, abrangendo 34% das amostras (85 amostras) nesta faixa de valores. Logo após, podemos observar que 32% das amostras (80 amostras) encontraram-se na faixa de 600-800 UFC/g, conforme demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2. Faixas de valores das contagens, frequência e porcentagens de *Clostridium* spp, em amostras de solo de pastagem da micro-região de Jaboticabal, SP.

CONTAGEM (UFC/g)	FREQÜÊNCIA AMOSTRAS	PORCENTAGEM
0 - 200	1	0,4%
200 - 400	17	6,8%
400-600	85	34%
600 - 800	80	32%
800 - 1000	29	11,6%
1000 - 1200	16	6,4%
1200 - 1400	4	1,6%
1400 - 1600	0	0,0%
4600 - 5000	1	0,4%

Os maiores valores das contagens foram obtidos nas propriedades 1,3,7,8,10,12,21,22, identificados e localizados na Figura 1. Os animais presentes nestas propriedades eram na maioria bovinos e em pelo menos duas propriedades havia a presença de caprinos.

As contagens de UFC apresentaram valores entre 140 e 4792 UFC/ g. O valor médio das contagens foi de 2,79 \log_{10} (UFC)/ g de solo de pastagem, entre os quais os valores mínimos e máximos em \log_{10} (UFC) obtidos foram 2,15 e 3,68 respectivamente, como demonstrado na Figura 7.

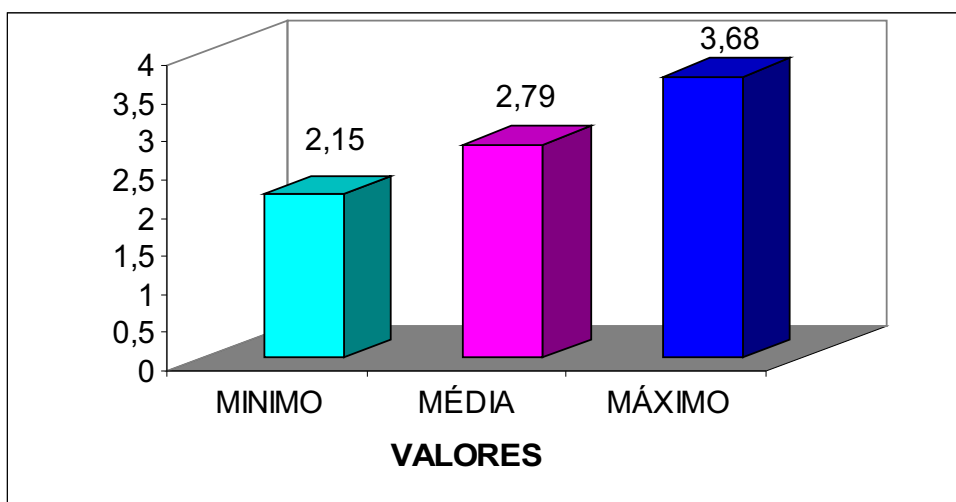


Figura 7. Valores médios das contagens de *Clostridium* sp em solo de pastagem, da micro-região de Jaboticabal - SP, no período de junho a dezembro de 2006.

As amostras foram coletadas no período de junho a dezembro, estação de fim de seca e início das chuvas. Assim, neste período houve uma elevação no índice pluviométrico permitindo a migração dos esporos de bactérias até a superfície do

solo. Por este fato, os resultados obtidos pelo presente experimento foi possível observar um aumento no número de esporos durante a contagem, sendo que as maiores contagens foram nos meses de setembro e outubro, nos quais houve um aumento de chuvas neste período, podendo-se relacionar o aumento de chuvas com maior aparecimento no número de esporos de *Clostridium* sp nas amostras (Figuras 8.e Figura 9.). Estes dados corroboram com BELL et al.,(1955) que descrevem que a estação chuvosa do ano propicia a ocorrência do botulismo, pois as mudanças na temperatura e condições ambientais são capazes de estimular a germinação de esporos e multiplicação desta bactéria.

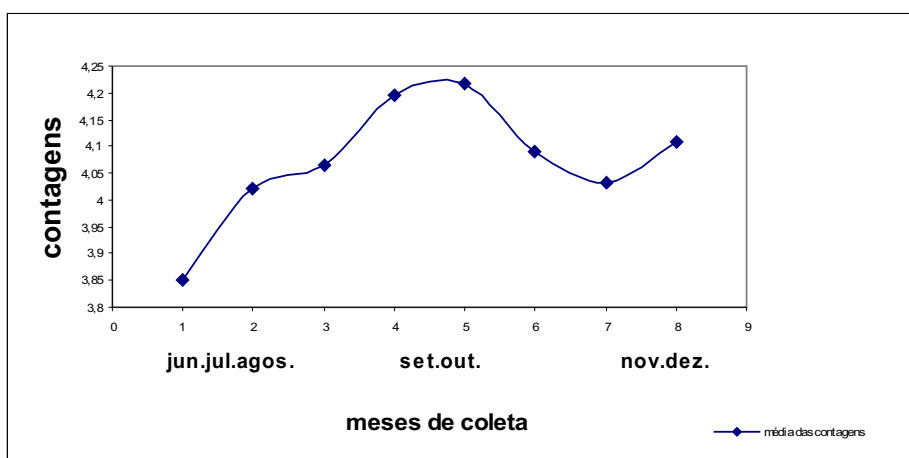


Figura 8. Relação entre as médias das contagens com os meses de coleta de amostras de solo de pastagem da micro-região de Jaboticabal-SP, no período de junho a dezembro de 2006.

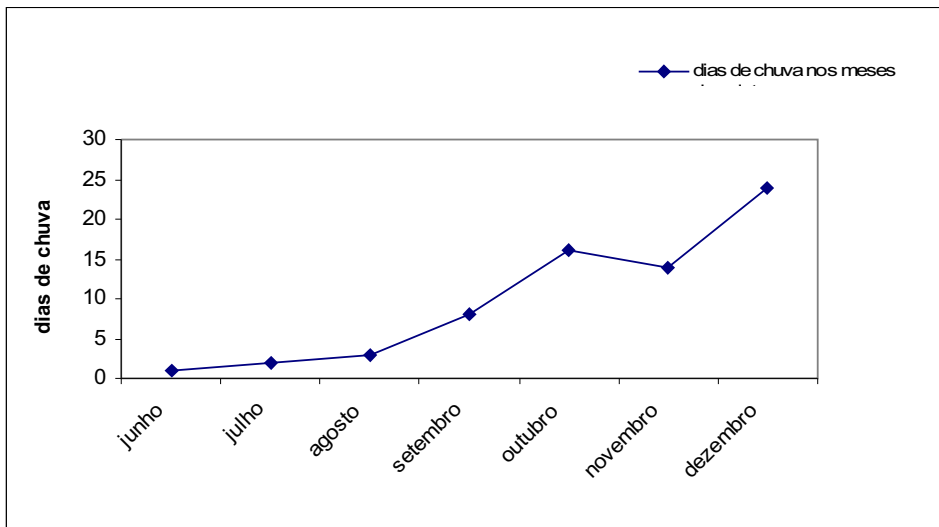


Figura 9. Dias de chuva nos meses de coleta de amostras de solo de pastagem da micro-região de Jaboticabal-SP, no período de junho a dezembro de 2006.

Diversos estudos têm sido realizados para se conhecer melhor a distribuição geográfica, a sobrevivência, a variabilidade sazonal do *C. botulinum* no solo e em sedimentos (SERIKAWA et al., 1977; MARION et al., 1983; SANDLER et al., 1993; LUQUEZ et al., 2005).

SANDLER et al. (1993), analisando a prevalência de *C. botulinum* em regiões pantanosas freqüentes e em regiões pantanosas por inundação provocada pela estação de chuva, no norte da Califórnia, relataram que houve um aumento na detecção deste microrganismo nos pântanos sazonais, principalmente no mês de setembro. GIRARDIN et al. (2005) observaram a influência sazonal no desenvolvimento populacional do *Clostridium sporogenes*. Estes resultados confirmam então um maior suporte e uma explicação bastante plausível para terem

sido encontrados, no presente experimento, maior contagens de bactérias anaeróbias durante a estação chuvosa, em algumas fazendas da micro-região de Jaboticabal-SP.

Em algumas fazendas, onde foram realizadas as coletas, havia a presença de pequenos cursos de água e as pastagens ali localizadas estavam em uma proximidade do rio que pode ter contribuído também para a influência de algum fator destas condições ambientais, sob determinados resultados que foram encontrados em nosso experimento. HANG'OMBE et al.(2000) relataram que os rios de Zâmbia, geralmente transbordam na estação de chuva e a maior parte das fazendas desta área usa o rio como fonte de abastecimento de água para o gado. Dessa forma, aumenta o risco de ocorrência de Clostridioses, na micro-região de Jaboticabal-SP. LEMOS (2005) ao estudar enfermidades do sistema nervoso de bovinos de corte das regiões Centro-Oeste e Sudeste, relata a ocorrência de intoxicação hídrica por botulismo em bovinos, decorrente do acúmulo de água da chuva ao redor de uma carcaça de bovino enterrada no pasto, e em outra, uma aguada parada na qual não foram encontradas carcaças.

São poucos os trabalhos recentemente realizados sobre o aspecto da contagem de bactérias anaeróbias obrigatórias (*Clostridium* sp), por este fato não houve como comparar o presente estudo com muitos trabalhos.

O mais recente estudo foi realizado na Alemanha, por GESSLER & BOHNEL (2006), que avaliaram a persistência e mobilidade de esporos de *C. botulinum* introduzidos no solo associado com um composto orgânico (adubo). Neste experimento, a contagem de bactérias anaeróbias detectadas no solo, a uma profundidade de 0-5 cm, foi demonstrada entre 8×10^5 e $2,5 \times 10^8$ UFC g⁻¹ e a profundidade de 10-30 cm, a contagem foi demonstrada entre $5,0 \times 10^5$ e $4,7 \times 10^7$ UFC g⁻¹. Porém, SMITH (1975) analisando 21 tipos diferentes de solo dos Estados

Unidos, incluindo de pastagem, determinou a contagem de bactérias anaeróbias obrigatórias, pelo método do Número Mais Provável, e relatou uma média entre $2,7 \times 10^2$ e $3,3 \times 10^6$ /g. GIBBS & FREAME (1965) determinaram a população clostridial em 6 amostras de solo utilizando o meio RCA (Reinforced Clostridial agar), demonstrando que a média da contagem variou de $3,5 \times 10^4$ a $1,2 \times 10^6$ UFC/g. Os resultados dos trabalhos acima descritos são superiores aos resultados obtidos pelo presente experimento, cujas médias variaram entre $1,4 \times 10^2$ e $4,8 \times 10^5$ UFC/g. Porém, nosso experimento permite conhecer o solo de pastagem da micro-região de Jaboticabal-SP, tal como a sobrevivência de bactérias anaeróbias nestes solos estudados, caracterizando como um fator de risco a saúde animal e considerando como um fator a contaminação ambiental por excrementos dos animais.

Os resultados obtidos para isolamento e identificação, entre o total de 250 amostras analisadas foram positivos em 233 amostras (93%), para bactérias anaeróbias esporuladas (*Clostridium* sp e *Bacillus* sp), conforme demonstrado na Figura 10.

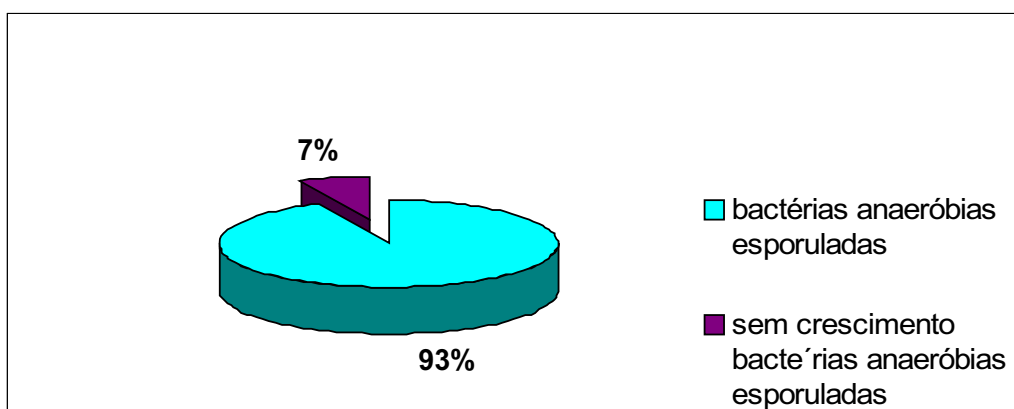


Figura 10. Ocorrência de bactérias anaeróbias esporuladas de solo de pastagem da micro-região de Jaboticabal,SP.

Entre as 233 amostras, 180 (72%) diferenciaram - se pelo método de Gram e Catalase negativo, classificando-os como do gênero *Clostridium*. Após a realização dos testes toxigenicidade em camundongos, foram identificadas 42 amostras (16,8%) de *Clostridium* sp patogênico, estes resultados podem ser visualizados na Figura 11.

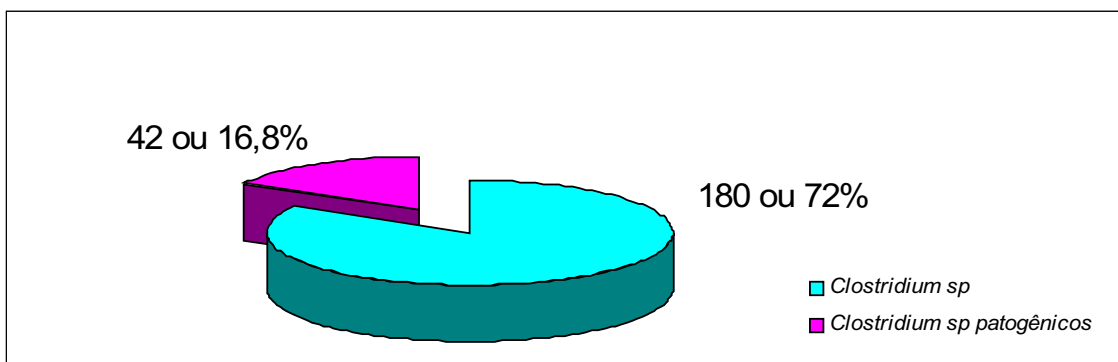


Figura 11. Ocorrência de *Clostridium* sp patogênicos em solos de pastagem, da micro-região de Jaboticabal,SP.

A reunião dos resultados das características culturais, toxigênicas e bioquímicas levaram a identificação de *Clostridium perfringens* em 23 amostras (9,2%), *Clostridium botulinum* em 13 amostras (5,2%) e *C. chauvoei* em 6 amostras (2,4 %). Todos os resultados obtidos pelo presente experimento estão descritos na Figura 12.

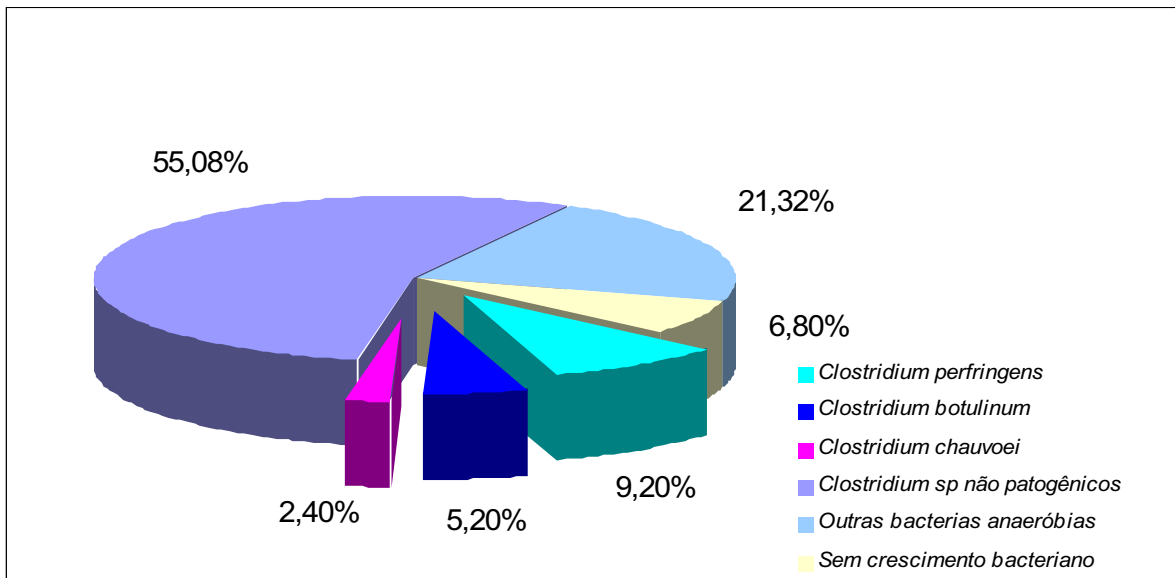


Figura 12. Isolamento e Identificação de *Clostridium* patogênicos em amostras de solo de pastagem, da micro-região de Jaboticabal, SP, no período de junho a dezembro de 2006.

As amostras positivas para *Clostridium botulinum* foram submetidas a verificação da presença de toxina botulínica, através do biosensaio em camundongos. O bioensaio em camundongos trata-se de um ensaio específico, pois apresenta alta sensibilidade toxicológica. O desenvolvimento e emprego de novas técnicas imunológicas para a detecção da toxina botulínica não exclui a necessidade da associação deste ensaio. DUTRA (2001) determinou a sensibilidade do bioensaio em camundongo obtendo positividade para a pesquisa de botulismo em 43,1% das amostras. Em nosso experimento, todas as amostras de *C. botulinum* foram positivas para toxina botulínica, ou seja, todas as 13 amostras (5,2%) de *Clostridium botulinum* isoladas do solo de pastagem analisadas foram produtoras de toxinas botulínica. Todos os resultados foram demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3. Caracterização e Identificação de *Clostridium* spp patogênicos em amostras de solo de pastagem, da micro-região de Jaboticabal-SP, no período de junho a dezembro de 2006.

Espécies de Clostrídios patogênicos isolados	Nºamostraspatogênicas isoladas	Nºamostras patogênicas isoladas em Porcentagem
<i>Clostridium perfringens</i>	23	9,2%
<i>Clostridium botulinum</i> (produtores de toxina botulinica)	13	5,2%
<i>Clostridium chauvoei</i>	6	2,4%
Total de amostras patogênicas isoladas	42	16,8%

Vários fatores podem contribuir para os resultados sobre a intensidade da contaminação ambiental por *Clostridium* sp. Dentre eles destacam-se a época do ano (SANDLER et al., 1993), tipo de solo (LEITÃO & DELAZARI, 1983), presença de surtos de botulismo e movimentação de animais responsáveis pela contaminação fecal (SMITH & YOUNG, 1980), águas estagnadas (LANGENEGGER & DOBEREINER, 1988), presença ou não de microorganismos inibidores (GRAHAM, 1978) e a existência de cadáveres na pastagem. Em nosso experimento, a época do ano (início das chuvas) e o acúmulo de água parada pelo pasto contribuíram para

detecção dos Clostrídios patogênicos isolados. Levando em consideração que os meses de setembro e outubro foram detectados maior número de amostras positivas para estas espécies bacterianas.

C. perfringens é o microrganismo patogênico de maior distribuição na natureza (CATO et al., 1989) e foi a espécie toxigênica encontrada com maior frequência em nosso estudo, seguindo-se o *C. botulinum* e o *C. chauvoei*.

Há uma enorme diversidade de microrganismos patogênicos presentes no solo, como já citado anteriormente, porém, na presente investigação não foi observada uma diversidade de bactérias em amostras de solos de pastagens devido que a metodologia para o isolamento de Clostridium implica num choque térmico com aquecimento das amostras a altas temperatura seguidas de um esfriamento em água com gelo o que elimina as formas não esporuladas. No entanto, a amostragem de nosso estudo é representativa, uma vez que foram isolados Clostrídios patogênicos aos animais, o que pode repercutir em grandes perdas econômicas. A grande dificuldade de isolar "in vitro" todos os microorganismos, em uma amostra tão complexa como o solo (RODRIGUEZ et al., 1993), pode explicar esta pequena diversidade encontrada em nosso estudo.

Os resultados obtidos pelo presente experimento foram menores que os demonstrados por HANG'OMBE et al. (2000) ao analisarem 46 amostras de solo de Zâmbia, para a presença do gênero *Clostridium*, e no qual descrevem a presença de *C. perfringens* em 14 amostras (30,43%) e de *Clostridium chauvoei* em 8 amostras (17,39%), no entanto não evidenciaram a presença de *C. botulinum*. Porém, SMITH & YOUNG (1980) analisando 174 amostras de solo britânico, demonstraram a presença de *C. botulinum* em 10 (5,7%) amostras, comparando aos nossos resultados podemos observar o isolamento de outras espécies patogênicas. KRIEK &

ONDENDAAL (1994) descrevem que o solo faz parte na determinação da sobrevivência do *C. chauvoei* em áreas de alta prevalência como no sul da África.

No presente experimento, o *Clostridium botulinum* foi encontrado em amostras de solos de pastagens, mas apresentou-se em menor porcentagem comparada ao *C. perfringens*, tal fato também foi encontrado por SMITH (1975) que descreveu que a presença de *C. perfringens* mais freqüentes nos solos analisados pode inibir o crescimento de *C. botulinum*. Um efeito inibitório do *Clostridium perfringens* sobre *C. botulinum* foi demonstrado em investigação realizada por MONGE-IZAGUIRRE & RODRIGUEZ (1999), ao confrontarem 38 cepas de *C. perfringens*, isolados de solos de Costa Rica, com cepas padrão (ATCC 19399) de *Clostridium botulinum*. Estes demonstraram que 58% das cepas de *C. perfringens* obtiveram um efeito inibitório sobre o *C. botulinum*. Embora sabendo que o *C. botulinum* foi detectado em menor porcentagem em nosso experimento, não é possível afirmar que houve um efeito inibitório e observar que um microrganismo conseguiu se sobressair mais que o outro, para tal seria necessário fazer "in vitro" um confronto para afirmar este fato, porém não foi o intuito do nosso experimento.

Em Costa Rica, no Planalto Central RODRIGUEZ et al. (1993) ao analisarem 30 amostras de solo identificaram 34 espécies de Clostrídios (patogênicos e não patogênicos), sendo 37% (11 amostras) de *C. perfringens*, descrevendo também que o *C. botulinum* se encontra presente em solos de Costa Rica, mas não foram detectados nas amostras analisadas.

SMITH (1975) analisou 21 amostras de solo dos Estados Unidos, e encontrou 11 tipos de Clostrídios, sendo que foi detectado *C. perfringens* em 2 amostras e em pelo menos 1 amostra era *C. botulinum*. Em contraste, SMITH (1977) em outro experimento, verificando a ocorrência de *C. botulinum* e *C. tetani* em 260 tipos de

solos diferentes, nos Estados Unidos, descreveu a presença de *C. botulinum* em 61 amostras (23,5%) de e *C. tetani*. (78) amostras (30%). Neste mesmo ano, SMITH et al. (1978) analisando 60 amostras de solo de Londres, descreveram a presença de *C. botulinum* em 15 amostras (25%).

Em nosso experimento, os resultados obtidos contradizem aos obtidos por LEITÃO & DELAZARI (1983) que ao analisarem 115 amostras de solo do Estado de São Paulo, sendo que 40 eram provenientes de pastagem de bovinos, 35 de pastagem de eqüinos e 40 de hortas comerciais, não relatando a presença de *C. botulinum* nas amostras de pastagens, mas nas hortas comerciais foram relatadas 15 amostras positivas para *C. botulinum*. Em nosso experimento, além da detecção de *C. botulinum*, podemos ressaltar a produção de toxina botulínica em todas as amostras positivas para *C. botulinum*. Cabe ressaltar que a metodologia empregada na tentativa de detecção da toxina por meio da inoculação em camundongos tem limitações práticas conhecidas, principalmente devido a sua baixa sensibilidade toxicológica e epidemiológica (DUTRA, 2001), porém neste trabalho pôde-se demonstrar a atual contaminação ambiental do microrganismo em questão.

Os resultados do presente estudo foram maiores do que os descritos por YAMAKAWA et al. (1990) ao investigarem a presença de *C. botulinum* e sua toxina em 12 solos do Kenya, no qual relataram a presença da toxina botulínica em 3 amostras (25%). CRETÍ et al (1990) analisando na cidade de Roma, a ocorrência de *C. botulinum* em 520 espécies de solo de pastagem nativa e cultivada, descreveram a ocorrência deste microrganismo em 7 amostras (1,3%), sendo estes produtores de toxina tipo A (6) e tipo B(1).

Na Argentina, LÚQUEZ et al., (2003) verificaram a presença de clostrídios produtores de toxina botulínica em 250 tipos diferentes de solos de Entre Rios,

demonstrando positividade para estes microrganismos em 63% (22/35) de solos cultivados, 17% (6/35) de solos virgens e 20% (7/35) de solos urbanizados. Em outro estudo, LÚQUEZ et al., (2005) avaliaram a distribuição de clostrídios produtores de toxina botulínica em 2009 solos da Argentina, relataram a maior prevalência deste microrganismo em solos não virgens sendo positivos em 364 amostras (27%). Comparando estes dados com os resultados obtidos pelo nosso estudo, podemos dizer que o microrganismo está presente no solo e que a sua grande maioria são produtoras de toxina botulínica como demonstrado por este trabalho.

No Brasil, na última década, tem havido um crescente número de diagnóstico de clostridioses em amostras de origem bovina em todo o país (BALDASSI et al., 1988; BALDASSI et al., 1989; BALDASSI et al., 1991; BALDASSI et al., 2000; BALDASSI et al., 2002). DOBEREINER (1979) e LANGENEGGER (1980) relatam surtos de botulismo ocorridos em vários municípios no Sul do Estado de Goiás, originando a morte de milhares de cabeças de gado. Mais Recente, COLODEL et al. (2003) descreveram surtos de enterotoxemias em cinco reservatórios caprinos no Estado do Rio Grande do Sul, em que 104 animais morreram.

OTUKI (2004) demonstrou a situação no Brasil quanto a Clostridioses em bovinos, no período de 2002 a 2003, em um total de 157 amostras, descrevendo o isolamento de *C. chauvoei* em 2 amostras (1,27%), *C. perfringens* em 36 amostras (22,9%), e a presença de toxina botulínica em 10 amostras (13,33%) entre 75 analisadas. Nosso estudo foi possível demonstrar que, mesmo na micro-região de Jaboticabal-SP onde não há grandes surtos de Clostridioses, os microrganismos patogênicos estão presentes no solo de pastagem, capazes de permanecerem no meio ambiente ou contaminar os animais que se utilizam o pasto como fonte de alimento e em condições favoráveis multiplicam-se e produzem de toxina,

desenvolvendo assim, Clostridioses. NOTERMANS et al (1981) descrevem que pode ocorrer persistência do *C. botulinum*, após surto de botulismo, no meio ambiente, principalmente nas pastagens, devido a constante contaminação do mesmo com as fezes contendo este microrganismo, uma vez que podem permanecer por anos sob a forma esporulada no solo.

A disseminação de esporos de Clostrídios no solo, geralmente, é carregada diretamente pelos animais carnívoros, pela chuva, pelo declínio da área e indiretamente pelo pasto, que ao nascer em local contaminado pelos esporos, provavelmente carrega-os com mais freqüência e sendo ingerido por qualquer herbívoro serão eliminados pelas fezes em outros pontos mais distantes (SOUZA & LANGENEGGER, 1987). Isto explica os resultados obtidos em nosso experimento, visto que a presença dos microrganismos isolados foi maior em épocas de chuva e a maioria das fazendas apresentava declividade nas áreas de pastagens, propiciando a transporte e isolamento dos Clostrídios patogênicos pelo presente trabalho detectados.

A grande maioria dos bovinos, vítimas de botulismo e enterotoxemia enriquecem o solo pela constante contaminação fecal, que tem o microrganismo como parte da flora intestinal normal (NILO, 1993; SMITH & SHERMAN, 1994). Assim como, a presença de carcaças no pasto, mesmo que o animal não tenha morrido por botulismo, seu cadáver pode ser fonte de intoxicação para outros animais. SOUZA (1985) demonstra bem a freqüência da distribuição de esporos de *Clostridium botulinum* nos cadáveres em decomposição, na região de Goiás. MOREIRA et al.(1980), também no Estado de Goiás, obtiveram toxinas de *C. botulinum* tipo C e D, a partir de culturas de solo provenientes de pastagens, onde ocorreu um surto de botulismo em bovinos. TURNES et al. (1984) em Alegrete, Rio

Grande do Sul, coletando amostras de solo sob restos de carcaças decompostas de bovinos, comprova a presença de toxina botulínica.

Admite-se que os esporos de *Clostridium* sp são ubiqüitários em todos os continentes e se mantêm no solo, mesmo em pequenas concentrações, durante anos. Sabe-se que os esporos passam inofensivamente através do tubo digestório dos animais vivos, mas com a morte do animal a flora bacteriana aeróbia, consumindo o oxigênio do trato digestório, propicia condições de anaerobiose para o desenvolvimento dos microrganismos anaeróbios principalmente o *C. botulinum* , cujas formas vegetativas invadem os tecidos em decomposição e produzindo toxinas letais. Se um caso esporádico ocorra em regiões com acentuada deficiência de fósforo, pode-se compreender o ato da osteofagia, porém em regiões com mineralização correta, os bovinos podem contaminar-se durante o ato de pastagem e desencadear a doença quando algum fator predisponente ocorrer ou apenas disseminar os esporos para outros locais através das fezes, promovendo uma contaminação ambiental. Que por sua vez contaminara o pasto que ali nascer carreando os esporos de *Clostridium* sp, formando uma cadeia epidemiológica.

A ocorrência em larga escala no país de surtos de botulismo e enterotoxemia, nas duas últimas décadas causaram sérios prejuízos econômicos aos produtores de bovinos e caprinos (DUTRA et al., 2005; BALDASSI et al., 2002;. COLODEL et al., 2003).

Vários fatores são sugeridos como predisponentes para a ocorrência da enfermidade (clostridioses), entre os mais importantes são: a diminuição do trânsito intestinal, mudanças bruscas na alimentação, mudança de pastagem de pobre para luxuriante, alimentação volumosos e ricos em grãos ou mal armazenadas (silagem de milho ou sorgo), dietas com altas quantidades de

proteína, verminoses, fatores estressantes, outras doenças debilitantes (UZAL, 1997).

O mais recente caso de diagnóstico de Carbúnculo sintomático (manqueira) descrito no Estado de São Paulo, foi relatado por GREGORY et al. (2006) em bovino com 1 ano de idade, sem raça definida, no qual apresentava dificuldade de locomoção do membro anterior direito, sendo que na região acometida observou-se mionecrose com crepitação ao toque e após a análise microbiológica foi detectada a presença de *C. chauvoei*. O *C. chauvoei* acomete bovinos, ovinos e caprinos de seis meses de idade a 3 anos, podendo ser endógeno ou ingerido. O animal ao se alimentar do pasto pode ingerir cerca de 2400 g de solo por dia, ingerindo concomitantemente a bactéria (GESSLER & BÖHNEL, 2006). A sobrevivência do microrganismo no solo sob a forma de esporos é o fator mais significativo para transmissão aos animais, pois a ingestão de pastos contaminados com esporos constitui-se na principal via de transmissão. No presente experimento foi possível verificar a sobrevivência de *C. chauvoei* nos solos de pastagem da micro-região de Jaboticabal-SP, demonstrando que a região não está isenta de microrganismos patogênicos. O carbúnculo sintomático ocorre mundialmente com índices que diferem dentro e entre áreas geográficas, sugerindo reservatório no solo ou fatores climáticos ou sazonais ainda não bem definidos. Uma vez que área geográfica tenha sido contaminada, os esporos persistem por anos. Os surtos de bovinos tendem a ser sazonais, ocorrendo mais comumente durante o verão e outono, especialmente depois de pesadas chuvas. Aparentemente há uma relação entre a prevalência de carbúnculo sintomático e a ocorrência de chuvas.

A verificação da ocorrência de Clostrídios patogênicos na micro-região de Jaboticabal-SP ressalta a importância da constante observação por parte dos

proprietários com cuidados de manejo e principalmente quanto a vacinação. Como sugestões para se evitar Clostridioses é necessário um controle e a profilaxia baseada em medidas adequadas de manejo e principalmente na vacinação adequada a todo o rebanho com imunógenos eficientes. É necessária também, a conscientização dos pecuaristas na realização da segunda dose da vacina conforme o programa e revacinação anual do rebanho; sendo muito comum os pecuaristas deixar de dar a segunda dose. Muitos acreditam que as clostridioses atingem somente animais jovens, mas já há relatos de animais infectados em fases mais adiantadas da vida, uma vez que os animais estão permanentemente em contato com os agentes e fatores que poderão desencadear a enfermidade.

A conscientização do fato e da necessidade de seguir com rigor os esquemas de vacinação, armazenamento de restos mortais de animais, armazenamento correto de silagem e a não utilização de camas de frango como silagem para a seca, fazem com que estas doenças possam ser evitadas e evitando assim, grandes perdas econômicas.

Os resultados obtidos pelo presente experimento assumem importantes significados, pois em todo território brasileiro, inclusive na micro-região de Jaboticabal-SP, é usual e viável a utilização de pasto como fonte de alimento para os bovinos, mesmo que complementada, que ao ser ingerido não deixa de ser uma fonte de transmissão de doenças como as Clostridioses.

5. CONCLUSÕES

Podemos concluir que:

➤ A ocorrência das bactérias anaeróbias esporuladas (*Clostridium* spp) no solo de pastagem de micro-região de Jaboticabal-SP foi significativa, com uma média de $2,79 \log_{10}$ UFC/g , confirmando a contaminação ambiental por estes microrganismos;

➤ A diversidade de bactérias de Clostrídios patogênicos nos solos de pastagem confirmou a presença de *Clostridium botulinum*, *C. perfringens* e *C. chauvoei* sendo estes um risco á saúde animal ;

➤ Dentre os isolados 5,2 % foi de *Clostridium botulinum*, todos produtores de toxina botulínica, que normalmente causa a morte do animal.

6. REFERÊNCIAS

ACHA, P.; SYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 2.ed. Washington: OPS/OMS, 1986. 989 p.

AURELI, P.; FERRINI; NEGRI, S. Ricerca delle spore di *Clostridium botulinum* nel miele. **La Revista Societá Italian Science Alimentari**, Pinerolo, v. 12, n.6, p. 457-60,1983.

ASSIS, R. A.; LOBATO, F. C. F.; MARTINS, N. E.; NASCIMENTO, R. A.; ABREU, V. L. V.; UZAL, F. A. An outbreak of malignant edema in cattle. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 97, n. 543, p. 143-145, 2002.

ASSIS, R. A.; LOBATO, F. C. F.; MARTINS, N. E. Clostridial myonecrosis in sheep after caseous lymphadenitis vaccination. **Veterinary Record**, v. 154, p. 380, 2004.

ASSIS, R. A.; FACURY FILHO, E. J.; LOBATO, F.C.F. Surto de carbúnculo sintomático em bezerros. **Ciência Rural**, v. 35, p. 945-947,2005.

BALDASSI, L.; HIPOLITO,M.; CALIL, E. M. B. ;CHIBA, S. ; MOULIN, A. A. Observações sobre a incidência da Gangrena gasosa e do carbúnculo sintomático durante 10 anos, 1970-1979, no Estado de São Paulo. **Arquivo Instituto Biológico**, v. 51, n. 6, p. 161-165, 1985.

BALDASSI, L.; HIPOLITO, M.; PORTUGAL, M.A.; CALIL, E. M. B. ; MOULIN, A. A. P. Presença de *Clostridium perfringens* em sistema nervoso central de bovinos apresentando sintomatologia nervosa. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 25, 1988, Salvador. **Anais...** Salvador, 1988. Resumo p 7.

BALDASSI, L. ; HIPOLITO, M. ; PORTUGAL, M.A.S.C. ; CALIL, E.M.B. ; MOULIN, A.A.P. ; PIRES, D.C. A bovine-like disease in Brazil. In: International Symposium of the Anaerobe Discussion Group, 6., 1989, Cambridge. VI INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF THE ANAEROBE DISCUSSION GROUP, Abstracts. Cambridge: Anaerobe Discussion Group, 1989. p. 36-36.

BALDASSI, L.; HIPOLITO, M.; PORTUGAL, M.A.; CALIL, E. M. B. ; MOULIN, A. A. P.; PIRES, D.C. Botulismo bovino: Comprovação laboratorial do diagnóstico clínico, período 1986-1989. **Revista Saúde Pública**, v. 25, n. 5, p. 371-374, 1991.

BALDASSI, L.; CALIL, E. M. B.; PORTUGAL, M.A. Morte súbita de caprinos por enterotoxemia. **Brazilian Journal Veterinary Animal Science**, v. 32, p. 109-113, 1995.

BALDASSI, L; ANDRADE, K.A.; ROJAS, M.V. Confirmação laboratorial do diagnóstico clínico de botulismo bovino no período de um ano. IN: 13. Reunião Anual do Instituto Biológico, 2000, São Paulo. **Arquivo Instituto Biológico**, 13., São Paulo, v. 67, supl., p.44, Resumo 035, 2000.

BALDASSI, L.; ROJAS, M. V.; MARICATO, J. T.; ANDRADE, K.A.; RIBEIRO, V. B.; CRUZ, P. R. Botulismo bovino: comprovação laboratorial da suspeita clínica no período de 1992 a 2001. In: **Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, 29., 2002, Gramado. **Anais....** p. 1084

BALDASSI, L. Clostridial toxins- potent poison medicines. **Journal of Venomous Animals**, v.11, n.4, p. 391-411, 2005.

BELL, J.F.; SCIPLE, G.W.; HUBERT, A. A.; A microenvironment concept of the epizootology of avian botulism. **Journal Wildlife Management**, v. 19, p. 352 - 354, 1955.

BIZZINI, B. *Clostridium tetani*. In: GYLES, C.L. ; THOEN, C.O. (Ed.) **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 2. ed. Ames: Iowa University Press, 1993. p. 97-105.

BOHNEL, H.; SCHWAGERICK, B. ; GESSLER, F. Visceral botulism – a new form bovine *Clostridium botulinum* toxication. **Journal Veterinary Medicine**, v. 48, p. 373 - 383, 2001.

CARTER, C.R.; CHENGAPPA, M.M. Clostridial enterotoxemia of calves. **Microbiology disease**. Ames: Iowa State University Press, Philadelphia, 1993. p. 79-81.

CASTEEL, M. J.; SOBSEY, M. D.; MULLER, J. P. Fecal contamination of agricultural soils before and after hurricane-associated flooding in North Carolina. **Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic Harzardous Substances and Environmental Engineering**, v. 41, n. 2, p. 173-184, 2006.

CATO, E.P.; LANCE, G.; FINEGOLD, S.M. *Clostridium perfringens*. **Bergey's: manual of systematic bacteriol.** Baltimore: Williams & Wilkins, 1989. v.4, p.1141-1144 e 1179-1183.

COLLIER, D.S.J.; COLLIER, S.O.; ROSSDALE, P.D. Grass sickness-the same old suspects but still no convictions. **Equine Veterinary Journal**, v. 33, p. 540-542, 2001.

COLODEL, E. M.; DRIEMEIER, D.; SCHMITZ, M.; GERMER, M.; NASCIMENTO, R. A. P.; ASSIS, R. A.; LOBATO, F. C.F. UZAL, F.A. Enterotoxemia em caprinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 4, p. 173-178, 2003.

CRETI, R.; FENICIA, L. AURELI, P. Occurrence of *Clostridium botulinum* in soil of the vicinity of Rome. **Current Microbiology**, v. 20, p. 317-321, 1990.

DHAKED R. K.; SHARMA, S. K. PARIDA, M. M. SINGH L. Isolation and charecterization of *Clostridium botulinum* type E from soil of Gwalior. **India Journal Nat. Toxins**, v. 11; p. 49-56, 2002.

DOBEREINER, J. **Relatório técnico**: projeto de patologia animal - EMBRAPA, Rio de Janeiro : 1979. p. 6.

DOBEREINER, J.; TOKARNIA, C.H.; LANGENEGGER, J.; DUTRA, J. Epizootic botulism of cattle in Brazil. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v.. 99, p. 188-190, 1992.

DUTRA, I.S.; DOBEREINER, J.; ROSA, I. V.; BOND, V. Botulismo de origem hídrica em bovinos no Brasil. World Buitrics Congress, 16., 1990, Bahia, **Anais...**p. 547-550.

DUTRA, I. S.; DOBEREINER, J. Fatos e teorias sobre a doença da vaca caída: botulismo. **A Hora Veterinária**; Porto Alegre, RS, v. 84, p. 7-10, 1995.

DUTRA, I. S. Epidemiologia, quadro clínico e diagnóstico pelo soro-neutralização em camundongos do botulismo em bovinos no Brasil, 1989-2001; **2001. 152 f. Tese (Livre Docência), Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Araçatuba, 2001.**

DUTRA, I.S.; DOBEREINER, J.; ROSA, I. V.; SOUZA, A.; NONATO, M. Surtos de botulismo em bovinos associados a ingestão de água contaminada. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 43-45, 2001.

DUTRA, I.S.; DOBEREINER, J.; SOUZA, A. Botulismo em bovinos de corte e leite alimentados com cama de frango. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 2, 2005.

GALEY, F.D.; TERRA, R.; WALKER, R.; ADASKA, J.; ETEHEBARNE, M.A.; PUSCHNER, B.; FISHER, E.; WITLOCK, R.; ROCKE, T.; WILLOUGHBY, E. Type C botulism in dairy cattle from feed contaminated with a dead cat. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, p. 204-209, 2000.

GAO, Q.Y. Distribution of toxigenic *Clostridium botulinum* in coastal areas in China. **Zhonghua Yufang Yixue Zazhi**. v. 18, p. 129-131, 1984.

GESSLER, F.; BOHNEL, H. Persistence and mobility of *Clostridium botulinum* spore population introduced to soil with spiked compost. **Microbiology Ecology**, v. 58, p. 384-393, 2006.

GIARDIN, H.; MORRIS, C. E.; ALBAGNAC, C.; DREUX, N.; GLAUX, C.; NGUYEN, C. Behaviour of the pathogen surrogates *Listeria innocua* and *Clostridium sporogenes* during production of parsley in fields fertilized with contaminated amendments. **Microbiology Ecology**, v. 54, p. 287-295, 2005.

GIBBS, B.; FREAME, B. Methods for the recovery of clostridia from foods. **Journal Applied Bacteriology**. v. 28, p. 95-111, 1965.

GIMENEZ, D. F. ; CICCARELLI, A. S. *Clostridium botulinum* en Argentina: present y futuro. **Revista Asociación Argentina Microbiología**, Buenos Aires, v. 8, n. 2, p. 82-91, 1976.

GONÇALVES, L. A.; FREITAS, T.; ASSIS, R.A. ; FACURY FILHO, E. J.; LOBATO, F.C.F. Primeiro relato no Brasil de mastite necrótica bovina por *Clostridium perfringens* tipo A. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1331-1333, 2006.

GRAHAM, R.; SCHWARZE, H. Botulism in cattle. **Journal Bacteriology**, v. 9, p. 69-83, 1921.

GRAHAM, J.M. Inhibition of *Clostridium botulinum* type C by bacteria isolated from mud. **Journal Applied Bacteriology**, v. 45, n. 2, p. 205-211, 1978.

GREGORY, L.; LIBERA, A. M. M.; JUNIOR BIRGEL, E. H.; POGLIANI, F.C.; BIRGEL, D.B.; BENESI, F.J.; MIYASHIRO, S.; BALDASSI, L. Carbúnculo sintomático: ocorrência, evolução clínica e acompanhamento da recuperação de bovino acometido de “manqueira”. **Arquivo Instituto Biológico**, v. 73, n. 2, p. 243-246, 2006.

GUERREIRO, M.; TEIXEIRA, M.; NUNES, C.A. A hemoglobinúria bacilar dos bovinos no Rio Grande do Sul. **Revista Faculdade Agronomia e Veterinária**, v. 5, p. 287-300, 1962.

HANG'OMBE, B. M.; et al. Detection and characterization of *Clostridium* species in soil of Zambia. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 23, p. 277-284, 2000.

HARBOLA, P.C.; KUMAR, A. A. Clostridial infections in animals. **Indian Veterinary Medicine Journal**, v. 14, p. 162-166, 1990.

HARIHARAN, H. & MITCHELL, W. R. Type C botulism: agent, host spectrum and environment. **Veterinary Bulletin**, v. 47 (2), p. 95-103, 1977.

HEITSCHMIDT, R.K. et al. Ecosystems, sustainability and animal agriculture. **Journal Animal Science**, v. 74, p. 1395-1405, 1996.

HOLT, J.G. **Bergey's**: manual of determinative bacteriology. 9. ed. Baltimore: Williams & Williams, 1994. p.186-187.

HULLAND, J. T. Muscle and Tendon. In: JUBB, K. V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. (Ed). **Pathology of domestic animals**. 4th.ed. San Diego: Academic Press, 1993, 183 p.

HUHTANEN, C. N.; KNOX, D.; SHIMAMANUKI, H. Incidence and origin of *Clostridium botulinum* spores in honey. **Journal Food Protection**, Iowa, v.44, n.11, p. 812-814, 1981.

HUSS, H. H. Distribution of *Clostridium botulinum*. **Applied and Environmental Microbiology** ,v. 39, n.4, p. 764 - 769, 1980.

JENSEN, R. **Diseases of sheep**. Philadelphia: Lea and Febiger, 1974.

KELCH, W.J.; KERR, L.A.; PRINGLE, J.K.; ROHRBACH, B.W.; WHITLOCK, R. Fatal *Clostridium botulinum* toxicosis in eleven Holstein cattle fed round bale haylage. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, p. 453-455, 2000.

KNOCK, G. G. Survey of soils for spores of *Clostridium botulinum* (Union of South Africa and South West Africa). **Journal Science Food Agriculture**, v. 3, p. 86-91,1952.

KODAMA, E. Epidemiological observation on botulism in Japan. **Toxin microorganism**. Washington: Ed. M. Hertzberg, Dept. of Interior, 1970. p. 404-409.

KRAVCHENKO, A. T. SHISHULINA, L.M. Distribution of *Clostridium botulinum* in soil and water in the U.S.S.R. In: INGRAM, M. ; ROBERTS, T. A. **Botulism** . London, Chapman and Hall, 1967. p. 13-20.

KRIEK, N. P. J.; ODENDAAL, M. W.; HUNTER, P. *Clostridium perfringens* type D enterotoxaemia. In: COETZER, J. A. W. ; THOMSON, G. R.; TUSTIN, R. C. (Ed.) **Infections diseases of livestock with special reference to Southern Africa**. Oxford: Oxford University Press, 1994. v. 2, 1314-1322; 1354-1371.

LANGENEGGER, J. **Relatório técnico**: Projeto de patologia animal. Rio de Janeiro. EMBRAPA, 1980. 6 p.

LANGENEGGER, J.; DOBEREINER, J.; TOKARNIA, C.H. Botulismo epizóotico em bovinos no Brasil. **Agropecuária Ciba-Geygy**, v. 20, p. 22-26, 1983.

LANGENEGGER, J.; DOBEREINER, J. Botulismo enzóotico em búfalos no Maranhão. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 8, n. 1/2, p. 37-42, 1988.

LEITÃO, M. F. F.; DELAZARI, J. *Clostridium botulinum* em solo no Estado de São Paulo. **Instituto Tecnologia Alimentar**, v. 13, p. 75 - 82, 1983.

LEMOS, R. A. A. **Enfermidades do sistema nervoso de bovinos de corte das regiões Centro-Oeste e Sudeste do Brasil**, 2005. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva), Faculdade Ciências Agrárias e Veterinárias –UNESP, Campus Jaboticabal-SP. 2005. 150p.

LOBATO, F. C. F.; ALMEIDA, A. C. Clostridioses. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 21, n. 3, p. 61-69, 1997.

LOBATO, F. C. F.; MORO, E.; UMEHARA, O.; ASSIS, R. A. ; MARTINS, N. E. ; GONÇALVES, L. C. B. Avaliação da resposta de antitoxinas beta e épsilon de *Clostridium perfringens* induzidas em bovinos e coelhos por seis vacinas

comerciais no Brasil. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 52, n.4, p. 313-318, 2000.

LOBATO, F. C. F.; ASSIS, R. A. Clostridioses dos animais. In: SIMPÓSIO MINEIRO DE BUIATRIA, 2., 2005, Belo Horizonte-Minas Gerais. **Anais...**p. 1-17.

LOBATO, F. C. F.; ASSIS, R. A. ; ABREU, V.L.V.; SOUZA Jr., M.F.; LIMA, C.G.R.D.; SALVARANI, F. M. Enterotoxemia em bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 952-954, 2006.

LUQUEZ, C.; FERNÁNDEZ, R. A.; BIANCO, M. I.; JONG, L.I.T.; SALDAÑO, V.; CICCARELLI, A. S. Presencia de clostrídios productores de toxina botulinica em suelos de Entre Rios. **Revista Argentina Microbiologia**, v. 35, n. 1, p. 45-48, 2003.

LUQUEZ, C.; BIANCO, L.; JONG, L.I.T.; SAGUA, G. N. A.; CICCARELLI, A. S.; FERNÁNDEZ, R. A. Distribution of Botulism toxin producing Clostridia in soil of Argentina. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, n. 7, p. 4137-4139, 2005.

MARION, W.R.T.; O'MEARA, G. D.; RIDDLE, H.A. Prevalence of *Clostridium botulinum* type C in substrates of phosphate-mine settling ponds and implication for epizootics of avian botulism. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 19, p. 302-307, 1983.

MASON, J. H. *Clostridium botulinum* type D in mud of lakes of the Zululand game parks. **Journal Science Agriculture Veterinary Medicine Association**, v. 39, p. 37-38, 1968.

McCLAIN, B.A.; ROOD, J.I.; SONGER, J. G.; TITBALL, R.W. The clostridia: molecular biology and pathogenesis. Great Britain: Academic Press, 2004, 584 p.

MEYER, L.F.; GUNNISON, J.B. *Clostridium botulinum* type D. **Proceeding of Society Experimental Biology Medicine**, v. 26, p. 88-89, 1928.

MONGE-IZAGUIRRE, M.; RODRIGUEZ, E.C. Efecto inhibitorio de *Clostridium perfringens* sobre *C. botulinum* em muestras de suelo. **Revista Biomédica**, v. 10, n.4, p. 209-215, 1999.

MOREIRA, E.; LIMA, J. D.; LEITÃO, R. Botulismo no sul de Goiás e Marajó. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA**, 17, 1980, Fortaleza. Anais... p. 24. Resumo.

MORRIS, W.E., UZAL, F.A., FATTORINI, F.R. e TERZOLO, H. Malignant edema associated with blood sampling in sheep. **Australian Veterinary Journal**, v. 80, p. 280-281, 2002.

NIEVES, B. ; GABALDON,P. *Clostridium botulinum* em suelos Del estado Mérida, Venezuela. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 36, p. 131-137, 1976.

NILO, L. Enterotoxemia *Clostridium perfringens*. In: GYLES, C.L.; THOEN, C. O. (Ed). Pathology of bacteriology infection in animal. **AMES: Iowa State University Press**, p. 114-123, 1993.

NOTERMANS, S.; KOZAKI, S.; SCHOTHORST, M. Toxin production by *Clostridium botulinum* in grass. *Applied Environment Microbiology*, v. 38, p. 767-771, 1979.

NOTERMANS, S.; DUFRENNE, J.; OOSTEROM, J. Persistence of *Clostridium botulinum* type B on a cattle farm after an outbreak of botulism. **Applied Environment Microbiology**, v. 41 n.1, p. 179-183, 1981.

ONDERDONK A. B. & ALLEN, S. D. *Clostridium*. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. (Ed.). **Manual of clinical microbiology** 6th ed., Washington: ASM Press, 1994. p. 574 - 586.

OXER, D.T. Enterotoxaemia in goats. **Australian Veterinary Journal**, v. 32, n. 65, p. 62-66, 1956.

OTUKI, A. K.; BALDASSI, L. Morte de eqüino puro sangue determinada por mionecrose. **Arquivo Instituto Biológico**, v. 71, p. 1-749, 2004.

PELCZAR Jr., M. J.; CHAN, E. C. S. KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**, 2^a. ed., São Paulo: Makron Books, 1996, v. 2, p. 306 – 311.

PINEDA, Y.; APONTE, F.; SANTANDER, J. Aislamento de *Clostridium perfringens* em um ternero de Venezuela. **Revista Científica**, v.14, n.3, p. 226-229, 2004.

POLAQUINI, L. E. M.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; ÀVILA, F. A. ; MEIRELES GAMA, L. F. S. A.; CARNEIRO, A. P. M. Isolamento de *Clostridium botulinum* e toxina botulínica em amostras de cama de frangos, utilizada na alimentação de bovinos confinados. **Ars Veterinária**, v. 19, n.2, p. 150-155, 2003.

PREVOT, A.R.; TURPIN, A.; KAISER, P. **Les bactéries anaérobies**. Paris: Dunod, 1967. v. 2, p. 1323-1639.

PUGH, D. G. Causes of diarrhea in older lambs and kids. **Sheep and goat medicine**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2002. p. 84-88.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.K.; CARTER, G.R. *Clostridium* species. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Wolfe, 1994. p. 191 – 208.

RIBAS, A.I.; FERREIRA, R.M.M.; MASSSER, R.C.; CIANI, R.B.; DUTRA, I.S. Detecção de esporos de *Clostridium botulinum* em costelas de cadáveres decompostos de bovinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23., 1994, Olinda. **Anais...**Olinda: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1994. p. 142.

RODRÍGUEZ, E.; GAMBOA, M. M.; FERNÁNDEZ, B. Clostrídios mesófilos em solos de la Meseta Central de Costa Rica. **Revista Biología Tropical**, v. 41 n. 3, p. 359-365, 1993.

SANDLER, R.J.; ROCKE, T.S.; SAMUEL, M.D.; YUILL, T.M. Seasonal prevalence of *Clostridium botulinum* type C in sediments of northern California wetland. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 29, n. 4, p. 533-539, 1993.

SARAIVA, D. Enterotoxemia em bovinos de 6 dias de idade, produzida pelo *Clostridium perfringens* tipo A. **Ciência Rural**, v. 8,n.3, p. 205 - 210, 1978.

SCHOCKEN-ITURRINO, R. P. **Pesquisa de *Clostridium botulinum* e teste de inoculação em produtos cárneos embalados a vácuo.** Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1980.

SCHOCKEN-ITURRINO, R. P. **Botulismo experimental em aves.** 1986. 116 f. Tese (Livre Docência), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1986.

SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; ÀVILA, F. A.; BERCHIELLI, S. C. P.; NADER, F. A. First case of type A botulism in Zebu (*Bos indicus*) **Veterinary Record**, London, v. 126, n. 9, p. 217-218, 1990.

SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; ÀVILA, F. Botulismo em bovinos confinados provocado pelo consumo de cama de frango contaminada. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 43, n. 3, p. 279-280, 1991.

SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; NEVES, E.B.; GAMA, L.F.S.A; CARVALHO, A. C. F. B.; ÀVILA, F.; SCHOCKEN, R. P., BERCHIELLI, S.P. Presence of viable spores of bacteria of genus *Clostridium* in muscles and liver of bovine slaughtered for consumption. **Ars Veterinaria**, v. 16, n. 2, p. 109-111, 2000.

SEDDON, H.R. Bulbar paralysis in cattle due to the actions of toxigenic *Bacillus*, with a discussion on the relationship of condition to the forage poisoning (botulisms). **Journal Comparative Pathology and Therapeutics**, v. 35, p. 147-190, 1922.

SEGNER, W. P.; SCHIMIDT, C. F.; BOLTZ, J. K.; Minimal growth temperature, sodium chloride tolerance, pH sensitivity and toxin, production of marine and terrestrial strains of *Clostridium botulinum* type C. **Applied Microbiology**, Washington, v. 22, p. 1025 – 1029, 1971.

SERIKAWA, T.; NAKAMURA; NISHIDA, S. Distribution of *Clostridium botulinum* type C in Ishikawa Prefecture, and applicability of agglutination to identification of nontoxigenic isolates of *Clostridium botulinum* type C. **Microbiology and Immunology**, v. 21, p. 127-136, 1977.

SILVA, T.M.D.; DUTRA, I.S.; CASTRO, R.N.; DOBEREINER, J. Ocorrência e distribuição de esporos de *Clostridium botulinum* tipos C e D em áreas de criação de búfalos na Baixada Maranhense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 3/4, p. 127-131, 1998.

SILVEIRA, D.; SOUZA, A. M. ; MESQUITA, A. J. Enterotoxemia em bovinos: uma enfermidade de importância em emergente. **Boletim Técnico Rhodia-Mériux**, v. 2, p. 1-4, 1995.

SMITH, L. Common mesophilic anaerobes, including *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani*, in 21 soil specimens. **Applied Microbiology**, v. 29, n.5, p. 590-594, 1975.

SMITH, L. D. Botulismo. El microorganismo, sus toxinas, la enfermedad. Zaragoza: Acribia, 1977. 214 p.

SMITH, L. D. The occurrence of *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani* in soil of the United States. **Health Laboratory Science**, v. 15, n.2, p. 74-80, 1978.

SMITH, L.D.; WILLIAMS, B. L. **The pathogenic anaerobic bacteria**, 3.ed., Springfield: C. C. Thomas, 1984. 550 p.

SMITH, L.D.; SUGIYAMA, H. **Botulism: the organism, its toxins, the disease**. 2. ed. Springfield: Charles C. Thomas, 1988, 171 p.

SMITH, L. S. **Botulism the organism, its toxins, the disease**, Springfield: Charles Thomas, 1977, 236 p..

SMITH, G. R.; YOUNG, A. M. *Clostridium* in British soil. **Journal Hygiene** , v. 85 n.2, p. 271 – 274, 1980.

SMITH, M.C.; SHERMAN, D.A. Enterotoxemia. **Goat Medicine**. Philadelphia: Lea e Febiger, 1994. p. 289-305.

SOUZA, A. M. **Distribuição de esporos de *C. botulinum* no solo em torno de cadáveres decompostos de bovinos, vítimas de botulismo em pastagens no Sul de Goiás**. Belo Horizonte, 1985. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Universidade Federal Minas Gerais, Belo Horizonte, 1985.

SOUZA, A. M.; LANGENEGGER, J. Esporos de *Clostridium botulinum* em torno de cadáveres decompostos de bovinos em pastagem no sul de Goiás. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 7, n. 1, p. 17-22, 1987.

STERNE, M.; BATTY, I. *Pathogenic Clostridia*. London: Butterworth, 1975. 144 p.

STERNE, M. Clostridial Infections. **British Veterinary Journal**, v. 137, n.5, p. 443-454, 1981.

TAVARES, W. **Contribuição ao conhecimento da distribuição natural do *Clostridium tetani* no Estado do Rio de Janeiro**. 1985. 235 f. Tese (Livre

Docência), Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro, 1985.

TOKARNIA, C. H.; LANGENEGGER, J.; LANGENEGGER, C. H. & CARVALHO, E. V. Botulismo bovinos no Piauí, Brasil, **Pesquisa Agropecuária Brasileira Serie. Veterinária**, v. 5, p. 465-472, 1970.

TOME JR., J. B. **Manual para interpretação de análise de solo**. Guaíba-RS: Agropecuária, 1997, p. 45-48.

TURNES C. G.; LANGENEGGER, J. SCARI, R. M. “Mal do Alegrete”, evidencias de *Clostridium botulinum* D como agente etiológico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 19º, 1984, Belém. **Anais....** p. 138.

UZAL, F.A.; KELLY, W.R. Effects of the intravenous administration of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin on young goats and lambs. **Journal Comparative Pathology**, v. 116, p. 63-71, 1997.

UZAL, F.A.; KELLY, W.R.; THOMAS, R.; HORNITZKY, M.; GALEA, F. Comparasion of four techniques for detection of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in intestinal contents and other body fluids of sheep and goats. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, n. 2, p. 94-99, 2003.

VALENTE ,C.; CUTERI, V. Infezioni da batteri del genere *Clostridium* . **Praxis Veterinary**, n.1, p. 8-12, 1997.

VESCHI, J.L.A. ; MIYAKAWA, M. F.; DUTRA, I.S.; ALVES, M.A.B.; BERMUDEZ, J. ;UZAL, F.A. Avaliação sorológica de vacinas contra a enterotoxemia causada pela toxina épsilon em caprinos.In: **Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, 2005, Búzios – Brasil, **Anais ...p.**

WAKSMAN, S. A.; WOODRUFF, H. B. Survival of bacteria added to soil and resultant modification of the soil population. **Soil Science**, v.50, p. 421-427, 1940.

WARD, B. W.; GARRET, E. S.; REESE, G.B. Further indications of *Clostridium botulinum* in latin American waters. **Applied Microbiology**, v. 15, p. 1509, 1967.

WILLIAMSON, J. L.; ROCKE, T. E. AIKEN, J. M. In situ detection of *Clostridium botulinum* type C₁ toxin gene in wetland sediments with a nested PCR assay. **Applied Environment Microbiology**, v. 65, p. 3240-3243, 1999.

YAMAKAWA, K.; KAMIYA, S.; YOSHIMURA, K.; NAKAMURA, S.; EZAKI, T. *Clostridium botulinum* in soil of Kenya. **Annals of. Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 84, n. 2, p. 201-203, 1990.

ZECHMEISTER, T. C.; KRISCHNER, A. K. T.; FUCHSBERGER, M. GRUBERL, S. G.; SUSS, B.; ROSENGARTEN, R.; PITTNER, F.; MACH, R. L. HERZIG A.; FRANLEITNER, A. H. Prevalence of *botulinum* neurotoxin C₁ and its corresponding gene in environmental samples from low and high risk avian botulism areas. **Altex**, v. 22, p. 185-195, 2005.

